

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**“EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA PROPORCIÓN DE LLENADO EN
UN BIORREACTOR DE LECHO MÓVIL CON BIOPELÍCULA (MBBR)
UTILIZANDO *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA BIODEPURACIÓN DE
COLORANTE EN EFLUENTES TEXTILES”**

Tesis presentada por la bachiller:
Luna Fuentes, Fiorella Ingrid

Para optar el Título Profesional de:
Ingeniera Biotechnóloga

Asesor: Dr. Jiménez Pacheco, Hugo Guillermo

AREQUIPA – PERÚ
2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20180000040454

N° Trámite en Fac. 398-2018

Fecha Recep. Fac. 04-09-2018

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: LUNA FUENTES, Fiorella Ingrid

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"EVALUACION DE UN REACTOR DE LECHO MOVIL CON BIOPELICULA (MBBR) PARA LA BIODEPURACION DE CONTAMINANTES EN EFLUENTE DE INDUSTRIA TEXTIL DE FIBRAS DE ALGODON-AREQUIPA"

DICTAMINADORES: Dr. Francisco Roque Rodríguez 2) Ing. Cinthia Córdova Barrios

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: "EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE LA BIODEPURACION DE EFLUENTES PROCEDENTES DE LA POSA DE TRATAMIENTO DE UNA INDUSTRIA TEXTIL, UTILIZANDO UN BIORREACTOR DE LECHO MOVIL CON BIOPELICULA (MBBR) USANDO LODOS ACTIVADOS", después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMAS:

FECHA 15-01-2019

ASESOR: Dr. Hugo Jiménez Pacheco

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor del trabajo de investigación presentado por la recurrente, tengo a bien informar que se ha verificado el cumplimiento de los objetivos y redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes por lo cual considero que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

FECHA 05/09/2019

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Ing. Cinthia Córdova Barrios
- 2) Dr. Francisco Roque Rodríguez
- 3) Dr. Fredy Molina Rodríguez

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis sugiriendo se cambie el título a: "EVALUACION DE LA INFLUENCIA DE LA PROPORCION DE LLENADO EN UN BIORREACTOR DE LECHO MOVIL CON BIOPELICULA (MBBR) UTILIZANDO Saccharomyces cerevisiae PARA LA BIODEPURACION DE COLORANTE DE EFLUENTES TEXTILES" y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, por lo que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

FECHA 04.10.2019

JURADOS: PRESIDENTE ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS
VOCAL DR. FRANCISCO ROQUE RODRIGUEZ
SECRETARIO DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ

FECHA 14/10/19

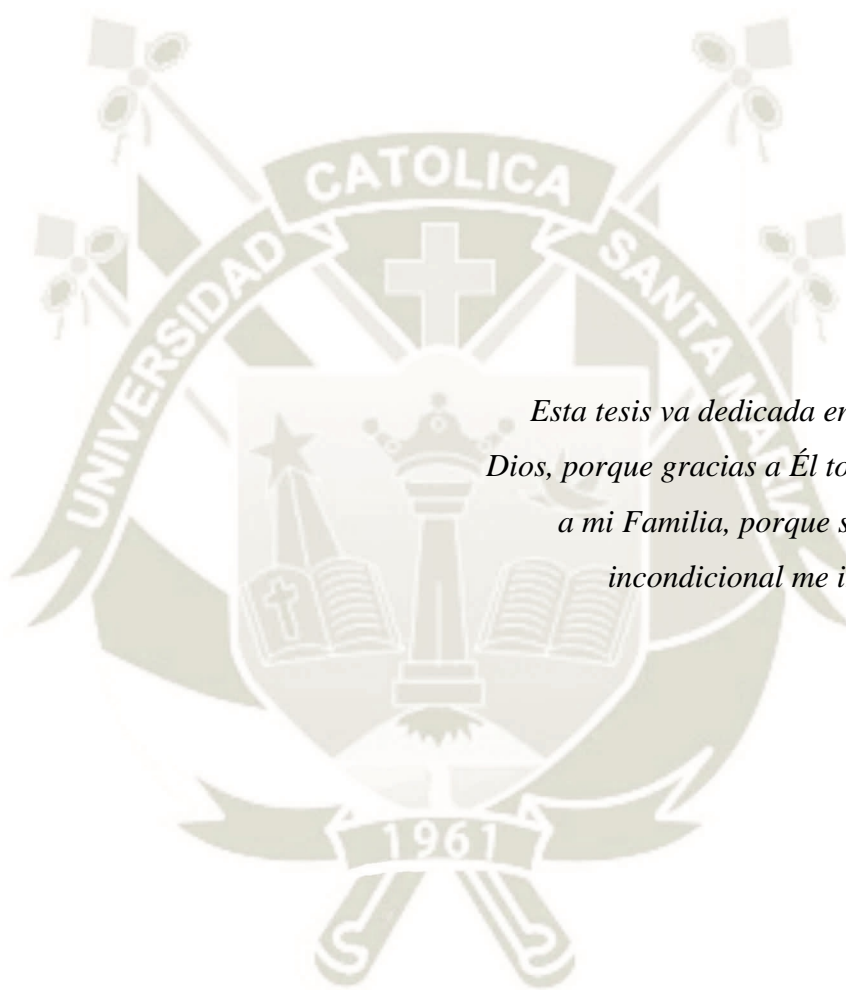
HORA 19.00

LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO

FECHA

DEDICATORIA



*Esta tesis va dedicada en primer lugar a
Dios, porque gracias a Él todo es posible; y
a mi Familia, porque su apoyo y amor
incondicional me impulsa a seguir
avanzando.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Angel Luna Paredes y Aurelia Fuentes Llerena y mi hermano Mauricio Luna Fuentes, por ser mi soporte, mi fuente de fuerza y motivación, y por creer en mi incluso cuando yo no podía.

A mi mejor amiga Angel Giuliana Ramirez Valverde, por su tiempo, apoyo, consejo e incontables risas durante todo este proceso de aprendizaje y en el día a día.

A la Universidad Católica de Santa María a través de su Instituto de Investigación e Innovación en Energías Renovables y Medio Ambiente – INNOVERGY, por el soporte brindado por el responsable del Instituto: Dr. Hugo Jiménez Pacheco, y todo el equipo de investigación, en los aspectos técnicos y en gestión administrativa.

A mis jurados, por su tiempo, paciencia y amabilidad brindados para que este trabajo se concretara con éxito.

A mis amigos, los que me acompañaron desde antes, y los que conocí en el camino, por hacer de los momentos difíciles más llevaderos y de los buenos, inolvidables.

Eternamente agradecida,

Fiorella Ingrid Luna Fuentes

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN	v
OBJETIVOS	vii
<input type="checkbox"/> General	vii
<input type="checkbox"/> Específicos	vii
HIPÓTESIS	vii
VARIABLES E INDICADORES	vii
TIPO DE INVESTIGACIÓN	viii
ALCANCE	viii
DELIMITACIÓN	viii
<input type="checkbox"/> Espacial:	viii
<input type="checkbox"/> Temporal:	viii
CAPITULO I	1
MARCO TEÓRICO	1
1.1 INDUSTRIA TEXTIL	1
1.1.1. Generalidades	1
1.1.2. Procesos	1
1.1.3. Colorantes	3
1.1.3.1. Colorantes reactivos	5
1.1.4. Contaminación	12
1.1.4.1. Normativas Legales	15

1.2 TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA DECOLORACIÓN DE EFLUENTE TEXTIL.....	17
1.2.1 Métodos físicos	17
1.2.2 Métodos químicos	18
1.2.3 Métodos Biológicos	21
1.3 BIORREACTOR DE LECHO MÓVIL CON BIOPELÍCULA (MBBR).....	23
1.3.1 Soportes	25
1.3.2 Biopelículas	26
1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
1.4.1 Generalidades	29
1.4.2 Mecanismo de acción.....	31
CAPÍTULO II.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2.1 MATERIALES.....	34
2.2 METODOLOGÍA.....	36
2.2.1 Evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en un medio sintético con colorante.....	36
2.2.2 Evaluación de la capacidad de remoción del colorante empleando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38
2.2.3 Diseño y construcción del Biorreactor de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR).....	39
2.2.4 Evaluación del funcionamiento de los sistemas MBBR utilizando efluente textil.....	42
CAPÍTULO III	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46

3.1 Evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en un medio sintético con colorante	46
3.2 Evaluación de la capacidad de remoción del colorante empleando <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49
3.3 Diseño y construcción del Biorreactor de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR).....	51
3.4 Evaluación del funcionamiento de los sistemas MBBR utilizando efluente textil	54
CONCLUSIONES	59
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de un colorante reactivo.....	8
Figura 2. Estructura de un colorante monoreactivo.....	9
Figura 3. Estructura de un colorante birreactivo con un solo grupo cromóforo.....	9
Figura 4. Estructura de un colorante boreactivo con dos grupos cromóforos.	10
Figura 5. Estructura molecular de un colorante de reactividad baja.	11
Figura 6. Adición del álcali para la formación cuantitativa de compuestos vinilsulfonil ...	12
Figura 7. Contaminantes emitidos durante el proceso de teñido textil.....	13
Figura 8. (a) Sistema MBBR con agitación aerobia. (b) Sistema MBBR con agitación anaerobia o anóxica	24
Figura 9. Tipos y características de soportes utilizados en el sistema MBBR.....	25
Figura 10. Micrografía de las células de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a mil aumentos. La barra representa 5 mm.....	30
Figura 11. Configuración de los puertos ubicados en la tapa del vessel. (1) Entrada de aire. (2) Entrada del efluente textil. (3) Salida de aire. (4) Puerto de toma de muestra.	39
Figura 12. Configuración interna del biorreactor. (1) Entrada de aire. (2) Entrada del efluente textil. (3) Salida de aire. (4) Puerto de toma de muestra. (5) Lecho móvil – soportes Kaldness K3.	40
Figura 13. Configuración del sistema experimental. (1 y 2) Bombas de aire. (3) Biorreactor MBBR. (4) Enchaquetado de Baño María. (5) Bomba dosificadora. (6) Tanque de almacenamiento de efluente textil.	41
Figura 14. Vista al microscopio de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> con aumento 40X puesta en la cámara de Neubauer Improved.	46
Figura 15. Recta de Calibración de la escala de McFarland	47
Figura 16. Curva de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en caldo de cultivo Sabouraud sintético suplementado con 50 mg/mL de colorante negro reactivo.	48
Figura 17. Recta de Calibración del colorante negro reactivo <i>Novacron – negro WNN</i>	49
Figura 18. Curva de remoción del colorante negro reactivo <i>Novacron – negro WNN</i>	51
Figura 19. Vista frontal de los sistemas MBBR configurados para la remoción de colorante negro reactivo de efluente textil. (a) Tanque de almacenamiento de efluente. (b) Biorreactor. (c) Equipo de Baño María. (d) Bombas dosificadoras.	52

Figura 20. Disposición de los puertos ubicados en la tapa del biorreactor. (a) Entrada de aire. (b) Toma de muestra. (c) Entrada de efluente. (d) Salida de aire..... 53

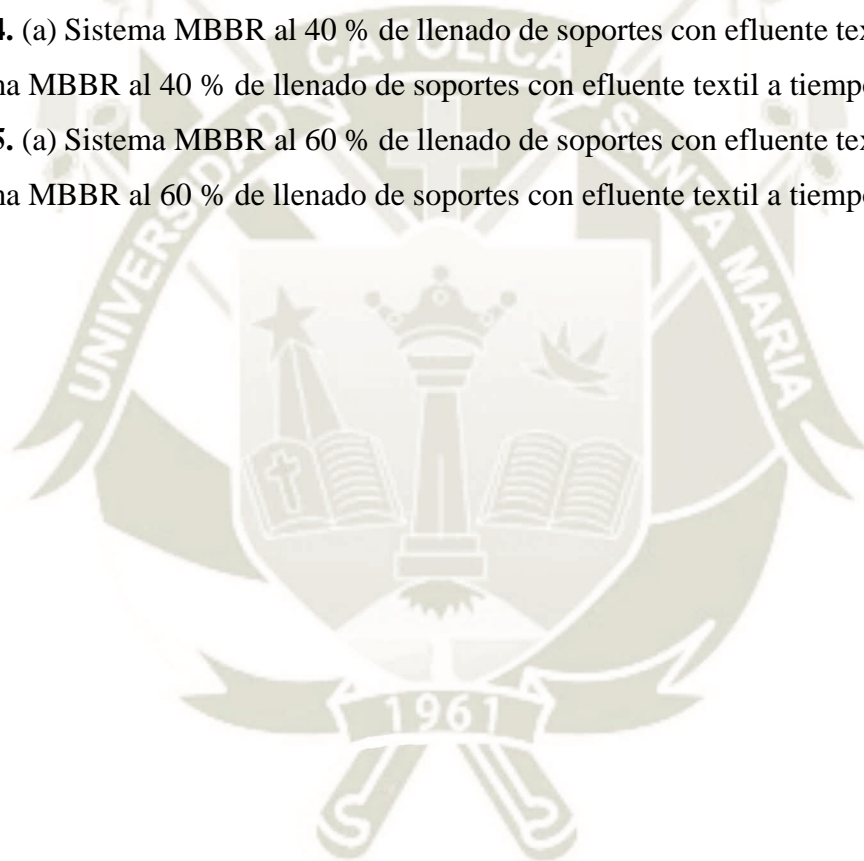
Figura 21. Curva de disminución de DQO en mg/L dependiendo del porcentaje de soportes utilizados..... 57

Figura 22. Curva de remoción de colorante en mg/mL a diferentes tiempos utilizando 20, 40 y 60 % de soportes por biorreactor 58

Figura 23. (a) Sistema MBBR al 20 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 0. (b) Sistema MBBR al 20 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 36..... 76

Figura 24. (a) Sistema MBBR al 40 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 0. (b) Sistema MBBR al 40 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 36..... 76

Figura 25. (a) Sistema MBBR al 60 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 0. (b) Sistema MBBR al 60 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 36..... 77



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación entre color y longitud de onda de luz absorbida/observada	5
Tabla 2. Grupos reactivos capaces de interactuar con la Celulosa	7
Tabla 3. Metales típicos encontrados en colorantes	14
Tabla 4. Anexo n°1. Valores Máximos Admisibles de las descargas de aguas no domésticas en el sistema de alcantarillado	16
Tabla 5. Anexo n°2. Valores Máximos Admisibles de las descargas de aguas no domésticas en el sistema de alcantarillado	16
Tabla 6. Tabla de medidas para la escala McFarland	37
Tabla 7. Datos técnicos MBBR	52
Tabla 8. Características del soporte Kaldnes K3	52
Tabla 9. Densidad de la biopelícula formada por proporción de llenado (mg/L).....	55
Tabla 10. Absorbancias obtenidas por estándar de concentración celular de acuerdo a la escala de McFarland	71
Tabla 11. Ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración de la escala de McFarland	71
Tabla 12. Absorbancias y concentración celular obtenidas por cada muestra a los diferentes tiempos.	72
Tabla 13. Absorbancias obtenidas por concentración de colorante en mg/mL.	72
Tabla 14. Longitud de onda y Ecuación de la recta utilizados para el gráfico de remoción del colorante por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
Tabla 15. Absorbancias y concentraciones en mg/mL obtenidas por muestra tomada a los diferentes tiempos.....	73
Tabla 16. Concentración de DQO en mg/L de las muestras obtenidas a los diferentes tiempos en los tres sistemas MBBR (20 %, 40 %, 60 %)	74
Tabla 17. Concentración de colorante residual en mg/mL de las muestras obtenidas a los diferentes tiempos en los tres sistemas MBBR (20 %, 40 %, 60 %).....	74
Tabla 18. Ecuación de la recta obtenida para el gráfico de remoción de colorante por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
Tabla 19. Absorbancias obtenidas en cada muestra tomada a los diferentes tiempos en cada sistema MBBR (20 %, 40 %, 60 %).	75

Tabla 20. Análisis de Varianza de un factor para la disminución de DQO en el efluente textil	78
Tabla 21. Análisis de Varianza de un factor para la remoción de colorante en el efluente textil.....	78



ABREVIATURAS

MBBR: Moving Bed Bioreactor

DQO: Demanda Química de Oxígeno

DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxígeno

COT: Carbono Orgánico Total

VMA: Valor Máximo Admisible

ANOVA: Análisis de Varianza

EDTA: Acido Tetracético de Etilendiamina

UV: Ultra violeta

ADEX: Asociación de Exportadores del Perú

ONU: Organización de las Naciones Unidas

DIGESA: Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria

mg/L: Miligramos por Litro

mg/mL: Miligramos por mililitro

g: Gramos

g/L: Gramos por Litro

ppm: Partes por millón

µm: Micrómetro

µL: Microlitro

rpm: Revoluciones por minuto

mL: Mililitro

nm: Nanómetro

L/min: Litros por minuto

RESUMEN

La contaminación por efluentes textiles es un problema de gran impacto tanto ambiental como de salud pública. Éstos contienen altas cantidades de detergentes, colorantes, entre otros agentes que causan un daño irreversible en el medio ambiente, e indirectamente en la población. Entre los agentes que causan más contaminación se encuentran los colorantes, es por eso que diferentes métodos son utilizados con la finalidad de remover dichos contaminantes de los efluentes como: procesos de adsorción con carbón activado, ozonización, oxidación electroquímica, decoloración utilizando agentes biológicos como hongos, bacterias o algas, entre otros. Sin embargo, estas tecnologías han demostrado tener media a baja eficiencia de remoción de colorante en relación al tiempo. Por lo tanto, en esta investigación se probaron tres Biorreactores de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR) con diferente proporción de llenado de soportes de polietileno de alta densidad, marca Kaldnes K3 (20, 40 y 60 % respectivamente) para la reducción de la concentración de colorante negro reactivo Novacron – negro WNN de dicho efluente, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo formador de biopelícula. Se realizó una adaptación de la cepa en caldo Sabouraud sintético con colorante negro reactivo con una concentración de 50 mg/mL; luego se evaluó la cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* a 0; 0.5; 1; 2; 4; 6; 10; 14; 20, 26; 30; 34; 38 horas, determinándose que la cepa tuvo una fase de adaptación de 2 horas, luego entró a su fase exponencial hasta la hora 30, momento en el cual empezó su fase estacionaria hasta la hora 38. Se determinó también que la cepa tuvo una velocidad específica de crecimiento de 0.0798 cel/mL x h y un tiempo de duplicación de 8.686 horas. Por otro lado, se evaluó la capacidad de remoción del colorante mencionado por la levadura a los mismos tiempos; determinándose que existió un porcentaje de remoción del 77.15 %, alcanzando una concentración final de 10.93 mg/mL. Seguidamente, se diseñó la configuración de los sistemas MBBR utilizando proporciones de soportes de 20, 40 y 60 % del volumen total del biorreactor, los que fueron inoculados con la cepa *Saccharomyces cerevisiae*. A continuación, se realizó la evaluación de la eficiencia de biodepuración del efluente textil midiendo el porcentaje de remoción de colorante negro reactivo y la capacidad de reducción de los valores de DQO en cada uno de los sistemas MBBR. Los resultados obtenidos en cuanto a la remoción del colorante mostraron que hubo una mayor eficiencia al 40 %, obteniendo un porcentaje de remoción de 20.3 %; seguido del biorreactor con un

llenado 60 %, que mostraba un porcentaje de remoción de 5.85 %; finalmente, el biorreactor con menor eficiencia de remoción de colorante fue el de 20 %, con un resultado de 3.02 % de remoción. Adicionalmente, los resultados obtenidos en cuando a la reducción de los valores de DQO en el efluente mostraron que, el mayor porcentaje de reducción se obtuvo en el biorreactor con 40 % de llenado de soportes, con una disminución de 72.21 %, seguido del biorreactor con 60 % de llenado de soportes con una disminución de 68.21 % y finalizando con el biorreactor con 20 % de llenado con un resultado de 59.73 %. Finalmente, se realizó un ANOVA de los resultados obtenidos, y se determinó que para el colorante existió un valor de p de 0.0791 y para el DQO un valor de 0.4283, en ambos casos no superan en valor probabilístico de 0.05; por lo que podemos decir que no se encontró diferencia significativa en los resultados obtenidos entre los tres sistemas MBBR; sin embargo, se determinó que el uso de *Saccharomyces cerevisiae* para la remoción de colorante y disminución de DQO es efectiva y que su tiempo de acción es de aproximadamente 30 horas. Además, se estima que se necesita un mayor tiempo de funcionamiento para la biodepuración total del efluente, dado que la cepa requiere de un mayor tiempo de adaptación al medio. Por lo tanto, este tratamiento es aconsejable para tratamientos de disminución de contaminantes y tratamiento de aguas residuales industriales.

PALABRAS CLAVE: Efluente textil, Sistema MBBR, *Saccharomyces cerevisiae*, biodepuración, colorante reactivo, DQO.

ABSTRACT

Pollution from textile effluents is a problem of great environmental and public health impact. These contain high amounts of detergents, dyes, among other agents that cause irreversible damage to the environment, and indirectly to the population. Among the agents that cause more contamination we can find the dyes, that is why different methods are used in order to remove these pollutants from the effluents such as: adsorption processes with activated carbon, ozonation, electrochemical oxidation, discoloration using biological agents such as fungi, bacteria or algae, among others. However, these technologies have been shown to have medium to low dye removal efficiency in relation to time. Therefore, in this investigation, three MBBR systems with different filling ratio of high density polyethylene carriers, from the brand Kaldnes K3 (20, 40 and 60 % respectively) were tested for the reduction of the concentration of reactive dye Novacron - black WNN of the mentioned effluent, using *Saccharomyces cerevisiae* as a biofilm-forming microorganism. An adaptation of the strain in synthetic Sabouraud broth with reactive black dye with a concentration of 50 mg / mL was performed; then the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* was evaluated at 0; 0.5; one; 2; 4; 6; 10; 14; 20, 26; 30; 3. 4; 38 hours, determining that the strain had an adaptation phase of 2 hours, then entered its exponential phase until hour 30, at which time its stationary phase began until hour 38. It was also determined that the strain had a specific speed of growth of 0.0798 cel / mL x h and a doubling time of 8.686 hours. On the other hand, the removal capacity of the dye mentioned by the yeast at the same time was evaluated; determining that there was a removal percentage of 77.15 %, reaching a final concentration of 10.93 mg / mL. Next, the MBBR system configuration was designed using support ratios of 20, 40 and 60 % of the total bioreactor volume, which were inoculated with the *Saccharomyces cerevisiae* strain. Following, the biodepuration efficiency of the textile effluent was evaluated by measuring the percentage of reactive black dye removal and the ability to reduce COD values in each of the MBBR systems. The results obtained regarding the removal of the dye showed that there was a greater efficiency at 40 %, obtaining a removal percentage of 20.3 %; followed by the bioreactor with a 60 % filling ratio, which showed a removal rate of 5.85 %; Finally, the bioreactor with the lowest dye removal efficiency was 20 %, with a result of 3.02 % removal. Additionally, the results obtained in the reduction of COD values in the effluent showed that the highest percentage of reduction was obtained in

the bioreactor with 40 % of filling media, with a decrease of 72.21 %, followed by the bioreactor with 60 % filling of supports with a decrease of 68.21 % and ending with the bioreactor with 20 % filling with a result of 59.73 %. Finally, an ANOVA of the results obtained was performed, and it was determined that for the dye there was a value of p of 0.0791 and for the COD a value of 0.4283, in both cases they do not exceed in probabilistic value of 0.05; so we can say that no significant difference was found in the results obtained between the three MBBR systems; however, it was determined that the use of *Saccharomyces cerevisiae* for dye removal and COD reduction is effective and that its time of action is approximately 30 hours. In addition, it is estimated that a longer retention time is needed for the total biodepuration of the effluent, since the strain requires a longer adaptation time to the environment. Therefore, this treatment is not advisable for treatment of purification, but for treatments to reduce pollutants.

KEY WORDS: Textile effluent, MBBR System, *Saccharomyces cerevisiae*, biodepuration, reactive dye, COD.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se sabe que uno de los mayores problemas ambientales es la contaminación de aguas por vertimiento de efluentes de diferentes procedencias. La industria textil es, después de la industria del petróleo, la segunda industria que causa más contaminación en el medio ambiente, según la Organización de las Naciones Unidas (ONU) (2015)¹, produce el 10% de las emisiones de carbono en el mundo y el 20% de las aguas residuales; sin embargo, es de la que menos conciencia se tiene². Estas empresas tienen una producción anual de aproximadamente 30 millones de toneladas de textiles, requiriendo 700 000 toneladas de colorantes³. Además, los efluentes que generan se caracterizan por tener parámetros extremos de Demanda Química de Oxígeno (DQO), Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), pH, color y salinidad^{4,5}.

La industria textil tiene como principales impactos ambientales el alto consumo de agua, utilizando entre 5 a 20% del agua disponible², y a su vez genera una significativa parte de la contaminación de las aguas y la emisión de aguas residuales con alta carga contaminante que se generan en los diversos procesos. Estos efluentes contienen diferentes químicos, dentro de ellos los más importantes son los colorantes, tales como: los colorantes directos, sulfurosos, reactivos, minerales, al cromo, dispersos, azoicos, básicos, ácidos, etc⁶⁻⁸. La liberación de estos colorantes sintéticos en el medio ambiente causa gran preocupación debido a la alta toxicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad y naturaleza xenobiótica; además de causar gran daño en el suelo, el agua y el medio ambiente en general⁹.

Se han realizado muchas investigaciones sobre la eliminación del color de los efluentes industriales, utilizando efluentes complejos y aguas residuales simuladas, que también son útiles para obtener información sobre cómo reaccionan los colorantes individuales a los diferentes tipos de procesos de tratamiento. Durante los últimos años, se han establecido regulaciones estrictas para el control del vertimiento de aguas residuales, especialmente con respecto a la eliminación de colorantes industriales¹⁰, razón por la cual, se buscan tecnologías eficientes, de bajo coste y que sean medioambientalmente amigables.

Es debido a esto que el presente estudio plantea el uso de la tecnología del Biorreactor de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR), con el propósito de indagar sobre la eficiencia de éste sistema a diferentes proporciones de soportes para la biodepuración del efluente textil, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como microorganismo formador de biopelícula. Para ello se evaluó la cinética de crecimiento de la levadura en un medio sintético con colorante; luego, se evaluó la capacidad de remoción de colorante de la misma; después se diseñó y construyó los sistemas MBBR; finalmente se evaluó el funcionamiento del biorreactor a diferentes porcentajes de llenado de soportes en el tratamiento de efluente textil.



OBJETIVOS

- **General**

Evaluar la influencia de la proporción de llenado en un Biorreactor de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR) utilizando *Saccharomyces cerevisiae* en la biodepuración de colorante en efluentes textiles.

- **Específicos**

1. Evaluar la cinética de crecimiento de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en un medio sintético con colorante.
2. Evaluar la capacidad de remoción del colorante empleando *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Diseñar y construir el Biorreactor de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR).
4. Evaluar el funcionamiento de los sistemas MBBR utilizando efluente textil.

HIPÓTESIS

Debido a se han empleado Biorreactores de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR) para el tratamiento de aguas residuales industriales y domésticas, y que se han utilizado tratamientos biológicos para remoción de colorantes, es posible que la proporción de soportes utilizados e inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* en un MBBR pueda impactar la eficiencia de biodepuración de efluentes textiles.

VARIABLES E INDICADORES

VARIABLES INDEPENDIENTES	INDICADORES
Proporción de soportes en relación a la cantidad de muestra de efluente	20%, 40%, 60%
VARIABLES DEPENDIENTES	INDICADORES
Calidad del efluente textil	DQO
Capacidad de biodepuración de la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Concentración de colorante en el efluente / cantidad de soportes usados

TIPO DE INVESTIGACIÓN

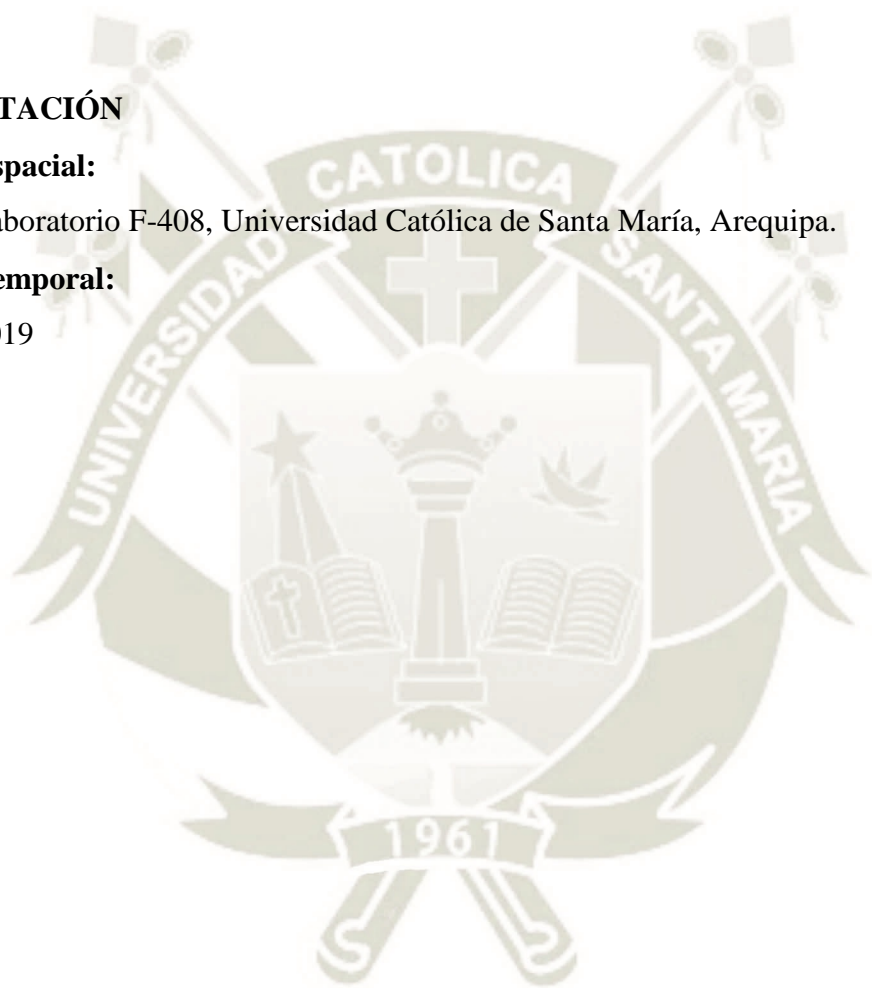
Investigación Experimental

ALCANCE

Alcance Correlacional

DELIMITACIÓN

- **Espacial:**
Laboratorio F-408, Universidad Católica de Santa María, Arequipa.
- **Temporal:**
2019



CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 INDUSTRIA TEXTIL

1.1.1. Generalidades

Según los datos del Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI)¹¹, la industria de textiles y confecciones en el Perú, cuenta con uno de los mayores índices de crecimiento en exportaciones de la última década, alcanzando un valor de crecimiento del 16.8 % desde Mayo del 2017 hasta Mayo del 2018. Según la Asociación de Exportadores del Perú (ADEX)¹², “en el 2018, las exportaciones de la industria textil y confecciones sumaron 1400 millones de dólares, monto mayor en 11.5 % respecto al 2017, siendo los principales destinos Estados Unidos, Brasil, Chile, Colombia y China que representaron el 66.3 % del total de los envíos, seguidos de Ecuador, Italia, Alemania, Bolivia y México”.

Por otro lado, como es explicado por el Ministerio de la Producción del Perú, la industria textil se encuentra mayormente agrupada en Lima, con un 69 % del total de las empresas localizadas en este sector. El 31 % de empresas restantes se encuentran distribuidas a lo largo del país, especialmente en los departamentos de Puno y Arequipa (5 % cada uno) debido a su relación con la industria ganadera¹³.

1.1.2. Procesos

Dentro de la industria textil se pueden distinguir dos subsectores; el primero consiste en la etapa inicial de la elaboración de telas y va desde el desmonte del algodón hasta el hilado, tejido y teñido. El segundo comprende todas las actividades relacionadas a la confección de prendas de vestir¹⁴. Por consiguiente, el proceso de elaboración textil explicado es el siguiente:

Hilado

Es el conjunto de operaciones mediante las cuales las fibras se transforman en hilos continuos y uniformes. Las operaciones realizadas en este paso son: la apertura

de las capas compactas de algodón en copos ligeros que facilitan la eliminación de partículas extrañas; el cardado y peinado de las fibras, en donde se mejora la uniformidad y la calidad de las fibras colocándolas paralelas entre sí; el estirado y mechado, en donde las fibras son estiradas y paralelizadas para después convertirse en hilos; el hilado propiamente dicho, que se encarga de adelgazar las mechas hasta la numeración deseada y se le confiere el grado de torsión necesario para lograr solidez y resistencia; finalmente está el bobinado y encarretado, proceso en el cual se enrollan las fibras en conos, boninas y rodetes⁸.

Tejido

Este proceso consiste en enlazar los hilos y tramarlos con otros con el propósito de transformar los hilos en telas. Para lograrlo, primero se realiza el urdido, aquí reúnen en un carrete una longitud y cantidad de hilos para luego colocar el título y medir el número de vueltas. En este proceso se usan ablandadores, que proporcionan flexibilidad a las fibras y lubrican los hilos. A continuación, se ejecuta el engomado, aquí se recubren las hebras con componentes de encolado, con el fin de darles resistencia y suavidad. Los agentes de encolado más comunes son el almidón, alcohol polivinílico (PVA), carboximetilcelulosa (CMC) y ácido poliacrílico (PM)⁸.

Desencolado

En este paso, se procede a limpiar la tela cruda de impurezas usando soluciones alcalinas, soda cáustica, carbonato de sodio o sulfito sódico a un pH de 10. Existen dos tipos de desencolado; el primero es el ácido, se da por la hidrólisis y solubilización de la fécula mediante ácidos inorgánicos diluidos. El segundo es enzimático, se da por el uso de enzimas vegetales o animales que descomponen la goma a su forma soluble⁸.

Descrude y Mercerización

Consiste en el lavado de las telas en autoclave con hidróxido de sodio diluido, carbonato sódico y aceite sulfurado para la eliminación de impurezas. Después se hace la mercerización que es el tratamiento de los tejidos con una solución de soda

cáustica a baja tensión y baja temperatura para hacer la tela más fuerte, lustrosa, absorbente y sensible al teñido⁸.

Lavado y Blanqueo

Es la eliminación del color natural de la tela para que quede lista para el proceso de teñido. Se utiliza inicialmente hipoclorito de sodio para el blanqueamiento, luego se lava y se seca para decolorarla nuevamente con bisulfito de sodio y ácido sulfúrico o clorhídrico diluido. Para el blanqueo se utiliza mayormente peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que por su potencial redox facilita el trabajo en frío o en caliente. El agente blanqueador varía de acuerdo al tipo de material a tratar⁸.

Teñido

Éste es el proceso que más contaminación genera, ya que utilizan colorantes, químicos y auxiliares de teñido. Estos últimos constituyen una parte integral del proceso, incrementando las propiedades de los productos termiandos⁸.

1.1.3. Colorantes

Un colorante es un compuesto capaz de impartir su color a un sustrato dado, tal como pintura, papel o algodón; esta capacidad está casi exclusivamente definida por su estructura química^{6,14}. En general, se puede definir como “cualquiera de los productos químicos pertenecientes a un extenso grupo de sustancias, empleados para colorear tejidos, tintas, productos alimenticios y otras sustancias solubles en medio ácido, neutro o básico, que poseen una estructura molecular no saturada, es decir son electrónicamente inestables y por eso absorben energía a determinada longitud de onda, si fueran estables absorberían todas o rechazarían todas”⁷.

Existen diferentes clases de colorantes:

- Colorantes directos: Utilizados para teñir lana, rayón y algodón; estas fibras se tiñen mediante cocción. Para teñir tejidos de algodón con tintes de azufre se prepara un baño con el tinte, carbonato sódico anhidro, sulfito sódico y agua caliente⁸.

- Colorantes sulfurosos: Reciben este nombre porque contienen azufre, generalmente formando una cadena (Ar-S-S-Ar' o Ar-S-S-S-Ar'), pero no como lo está en los colorantes director, pudiendo el azufre ser fácilmente oxidado a ácido sulfúrico. Tiñen las fibras directamente en estado reducido y se combinan con los colorantes básicos para dar una laca insoluble; la cantidad de colorante absorbido depende de su porcentaje en la solución, de la concentración de sal en el baño y de la temperatura. Son insolubles en agua, pero solubles en medio alcalino y en presencia de sulfuro sódico como agente reductor^{6,7}.
- Colorantes azoicos: Los colorantes azoicos comprenden una de las clases más grandes de colorantes sintéticos basados en derivados de hidrocarburos que son ampliamente utilizados en la industria textil¹⁵. La característica general de los colorantes azoicos es la presencia en las estructuras de uno o más grupos azo⁶. Su fundamento se basa en la formación de un pigmento coloreado de dos componentes sobre la fibra. El primer componente, un cromógeno denominado desarrollador, es un derivado naftalénico que contiene grupos amino e hidroxilo. El segundo componente es una solución de diazo, que al reaccionar con el desarrollador produce el colorante azoico sobre la fibra, éste influye en el desplazamiento del color en el espectro y se utiliza con mayor influencia en la solubilidad del colorante^{6,8}.
- Los tintes minerales: Son pigmentos inorgánicos en forma de sales de hierro y de cromo, que después de la impregnación se precipitan añadiendo una solución alcalina caliente⁶.
- Colorantes al cromo: Los colorantes de esta clase, también llamados cromatables o ácidos cromatables, necesitan el concurso de una sal de cromo para su perfecta fijación sobre la fibra⁸.
- Colorantes dispersos: Son compuestos orgánicos no iónicos casi insolubles en agua que se aplican en dispersión acuosa y se caracterizan porque tienen un alto

grado de dispersión. Cuentan con las siguientes estructuras: colorantes con grupos azo, principalmente monoazoderivados y algunos diazo, que abarcan una amplia gama de matices; colorantes nitro-difenil-amina para amarillos y anaranjados; colorantes antraquinónicos para anaranjados, verdes y azules. Estos colorantes son compuestos orgánicos no iónicos. Se emplean para la tintura de rayón, acetatos y poliésteres; también se usan con auxiliares^{7,16}.

1.1.3.1. Colorantes reactivos

Los colorantes poseen color porque absorben luz en el espectro visible (400 - 700 nm); tienen al menos un grupo cromóforo; tienen un sistema conjugado, es decir, una estructura con alternancia de enlaces dobles y simples; finalmente, exhiben resonancia de electrones, que es una fuerza estabilizadora en compuestos orgánicos. Cuando la estructura molecular carece de cualquiera de estas características, el color se pierde^{6,17}. En la Tabla 1 se muestran las relaciones entre el color absorbido y observado respecto a un rango determinado de longitud de onda.

Tabla 1. Relación entre color y longitud de onda de luz absorbida/observada¹⁷.

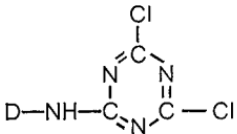
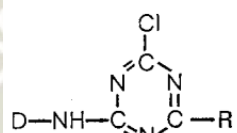
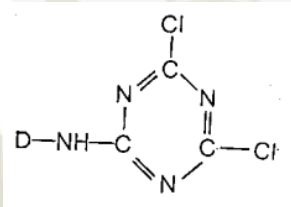
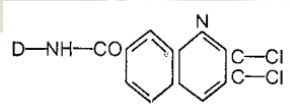

Longitud de onda absorbida (nm)	Color Absorbido	Color observado
400 – 435	Violeta	Amarillo verdozo
435 – 480	Azul	Amarillo
480 – 490	Verde azulado	Anaranjado
490 – 500	Azul verdozo	Rojo
500 – 560	Verde	Morado
560 – 580	Amarillo verdozo	Violeta
580 – 595	Amarillo	Azul
595 – 605	Anaranjado	Verde azulado
605 – 700	Rojo	Azul verdozo

Desde la década de 1950, se introdujeron los primeros colorantes reactivos comerciales, estos se han vuelto cada vez más populares. Esto se debe mayormente a los altos niveles de resistencia al lavado que tienen, y a la amplia gama de colores brillantes, además de la versatilidad que tienen para diferentes

métodos de aplicación y las excelentes propiedades de solidez que ofrecen cuando tiñen diferentes fibras celulósicas^{18,19}.

Los colorantes reactivos son tintes aniónicos solubles de estructuras no saturadas que, en solución, son repelidos por la superficie cargada negativamente de la fibra de algodón. Tienen uno o dos átomos de Cloro (Cl^-) que reaccionen con la celulosa y forman enlaces covalentes con los grupos nucleofílicos de la fibra textil²⁰. Por sus características químicas, sólo una parte del colorante que se introduce en el baño de color reacciona químicamente con la fibra, el resto reacciona con el agua y se denomina colorante hidrolizado, por lo que debe ser eliminado en sucesivos jabonados y aclarados en caliente. Finalmente, el colorante queda unido a la fibra mediante un puente de triázina y siempre que estos enlaces covalentes sean estables y estén unidos a los grupos hidroxilo de la fibra celulósica, entonces las propiedades de resistencia al lavado de las coloraciones serán sobresaliente^{18,21}. Para obtener los niveles deseados de resistencia al lavado, es necesario eliminar todo el colorante sin reaccionar e hidrolizado, es decir, sin fijar, de la fibra de algodón. Esto se logra a través de una serie de enjuagues y enjabonados²³. En la Tabla 2 se muestran algunos grupos reactivos existentes en el mercado.

Tabla 2. Grupos reactivos capaces de interactuar con la Celulosa²².

Nombre de los colorantes	Fórmula	Grupo Reactivo	Año
Remalán	$D-SO_2-CH_2-CH_2-O-SO_3 H$	Vinil Sulfona	1953
Cibalán brillantes	$D-NH-CO-CH_2-Cl$	Monoclorotriacínicos	1954
Proción M		Diclorotriacínicos	1956
Proción H		Monoclorotriacínicos	1957
Cibacrón		Monoclorotriacínicos	1957
Drimarén		Diclorotriacínicos	1960
Reactone		Diclorotriacínicos	1960
Levafix	$D-SO_2-NH-CH_2-CH_2-O-SO_3 H$	β -sustituídos sulfonamida	1960
Levafix E		Dicloroquinoxalina	1961
Primazin	$D-NH-CO-CH_2-CH_2-O-SO_3 H$	Acrilamida	1962
Drimalán Reactofix Verofix		Halógeno reactivo	1962
Procilán	$D-NH-CO-CH=CH_2$	Premetalizado acrilamido	1964

Para promover la transferencia por agotamiento del colorante a través de la fibra celulósica se agrega una sal como cloruro de sodio o sulfato de sodio²⁴, éstas hacen que la penetración de colorante en el interior de fibra, también llamado difusión, sea factible, conduciendo a una mejor fijación del colorante²⁵. La cantidad de sal puede variar hasta dos Kg por Kg de la fibra dependiendo de la estructura del colorante, la intensidad del color y el método de teñido. Una vez que haya suficiente colorante en la fibra, se agrega el álcali como carbonato de sodio, bicarbonato de sodio o hidróxido de sodio al baño de tinte para iniciar la reacción del colorante con la fibra. Las cantidades y la composición del álcali dependen del pH que se necesite para el tipo particular de grupo reactivo del colorante y el método de teñido^{18,26}.

Estructura básica de un colorante reactivo:

La estructura básica de un colorante reactivo se observa en la Figura 1.



Figura 1. Estructura básica de un colorante reactivo⁷.

Es así que cada parte del colorante reactivo es explicada a continuación:

- a. Cromóforo: Son todos aquellos compuestos que contienen electrones resonando a determinada frecuencia; por lo tanto, absorben luz²⁰. Contienen uno o varios dobles enlaces y son habitualmente de tipo azo, antraquinona o ftalocianina. Determina principalmente el matiz del colorante y es a la vez responsable de otras propiedades del colorante. Proporciona características como solubilidad, carga eléctrica (presencia de grupos sulfónicos; $-\text{SO}_3\text{Na}$), color, sustentividad, propiedades de difusión, lavabilidad y corrosibilidad⁷.

- b. Grupo Puente o Auxógeno: Es el enlace entre el colorante y el grupo reactivo. Son los responsables de la fijación de la molécula del colorante, en algunos casos aumentan la labor del cromóforo. Habitualmente son: Amino (-NH-), amido (-CO-NH-), sulfona (-SO₂-), sulfonamida (-SO₂-NH-). Estos grupos donan electrones y forman sales débiles fácilmente solubles para la reacción con la fibra celulósica^{7,20}.
- c. Grupo Reactivo: Es el responsable del tipo y velocidad de reacción entre el material textil y el colorante⁷.

Tipos de estructuras de colorantes reactivos:

Existen diferentes estructuras de colorantes reactivos, estos se explican a continuación⁷:

- a. Colorantes monoreactivos: Comprendidos por un grupo cromóforo y un grupo reactivo.



Figura 2. Estructura de un colorante monoreactivo⁷.

- b. Colorantes bireactivos con un solo cromóforo: Comprendidos por un grupo cromóforo y dos grupos reactivos.

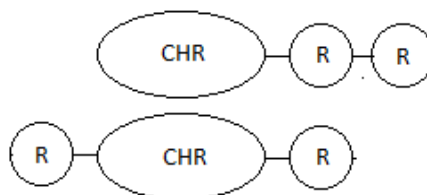


Figura 3. Estructura de un colorante bireactivo con un solo grupo cromóforo⁷.

- c. Colorantes bireactivos con dos cromóforos: Comprendidos por dos grupos cromóforo y dos grupos reactivo. En puente puede ser aromático, es decir, de baja difusión; o alifático, es decir, de alta difusión.

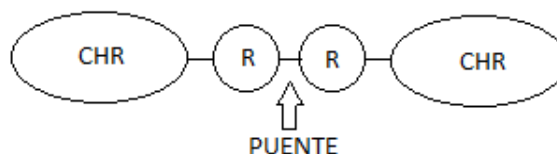


Figura 4. Estructura de un colorante boreactivo con dos grupos cromóforos⁷.

Colorantes reactivos según la reactividad:

Los colorantes reactivos se agrupan también según su reactividad. Los parámetros de mayor influencia son pH y temperatura, cuanto más elevados sean ambos valores, mayor será la velocidad de reacción del colorante. Es así que, a mayor alcalinidad del baño, mayor velocidad de reacción⁷. Por otro lado, dependiendo de la temperatura, los colorantes reactivos pueden ser:

- Altamente reactivos: Son los derivados de la Diclorotriazina. Las altas temperaturas de trabajo y condiciones alcalinas severas reducen rápidamente su estabilidad. Las soluciones preparadas de estos colorantes son de una duración muy corta, no más de un día.
- Muy poco reactivos: Son los derivados de la Monoclorotriazina. Son menos sensibles a los álcalis y poseen una muy buena estabilidad en general.
- Aplicados en baños por agotamiento bifuncionales: Son los derivados de la Bis-monoclorotriazina. Se comportan de una manera similar a los poco reactivos.
- Tipo vinilsulfona: Son los derivados de la β -Sulfoetilsulfona. Son sensibles a la dureza del agua por ello es conveniente que antes del agregado de los colorantes al baño de tintura éste se encuentre neutralizado (caso de aguas duras) empleando para ello 1 g/L de Hexametáfosfato de Sodio o un secuestrante adecuado.

Clasificación de los grupos reactivos:

- a. Grupos reactivos aromáticos: Son aquellos que forman ésteres de celulosa con las fibras celulósicas. En este grupo se encuentran los colorantes con anillos heterocíclicos y que su reacción es a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica como es el caso de un colorante monoclorotriazínico. Esta reacción se lleva a cabo porque la elevada electronegatividad del nitrógeno en el anillo hace que se produzca una deficiencia electrónica en el carbono adyacente haciendo que éste sea susceptible de ataque por compuestos o grupos nucleofílicos dando lugar a una reacción de esterificación, como se muestra en la Figura 5^{7,20}.

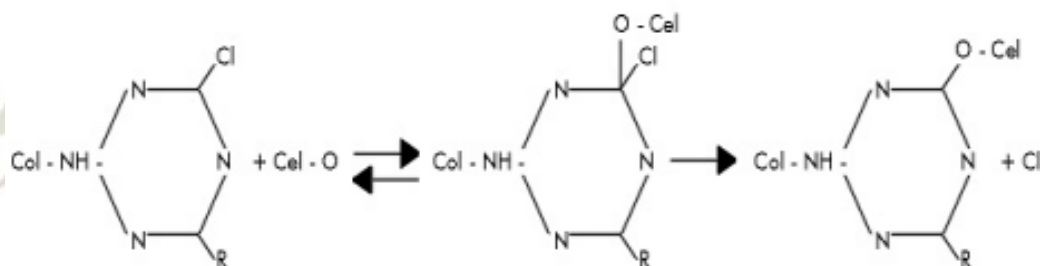


Figura 5. Estructura molecular de un colorante de reactividad baja²⁰.

- b. Grupos reactivos alifáticos: Son aquellos que forman éteres de celulosa con las fibras celulósicas. En este grupo se encuentran los colorantes vinilsulfonados y acrilamídicos los cuales reaccionan a través de un mecanismo de adición nucleofílica al doble enlace entre carbonos (C=C). Sin embargo, si bien el doble enlace no existe en el colorante reactivo inicial, se forma fácil y rápidamente incluso a temperatura ambiente. La formación de la vinilsulfonas se da probablemente debido a que en medio básico se forman los grupos $-\text{SO}_2-$ o $-\text{CO}-$ que son electro-atrayentes, y que facilitan el ataque nucleofílico del carbono β , finalizando la reacción por la captación de un protón como se observa en la Figura 6^{7,27}.

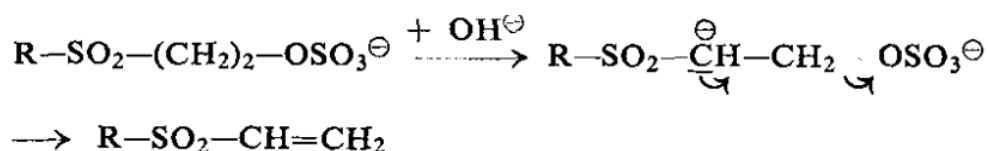


Figura 6. Adición del álcali para la formación cuantitativa de compuestos vinilsulfonil²⁷

1.1.4. Contaminación

La industria textil es caracterizada por ser la actividad que genera más residuos en comparación a otras industrias, haciéndola una de las mayores fuentes de contaminación en la actualidad^{2,29}. El interés por el control del vertido de colorantes ha ido en aumento debido al alto nivel de peligrosidad que representan. Los efluentes emitidos por esta industria se caracterizan por tener un gran impacto adverso en la calidad del medio ambiente. La producción anual mundial de textiles es de cerca de 30 millones de toneladas, requiriendo aproximadamente 700 000 toneladas de diferentes colorantes³, los cuales son vertidos a los alcantarillados causando daños irreversibles.

Los principales contaminantes dentro de los efluentes textiles son los compuestos orgánicos recalcitrantes, color, compuestos inhibitorios, surfactantes y compuestos clorados³¹. Los cuales alteran parámetros tales como, sólidos suspendidos, carga iónica, biológica de oxígeno (DBO₅), carbono orgánico total (COT), y demanda química de oxígeno (DQO), pH, color y salinidad^{2,32}. Sin embargo, los contaminantes con más impacto, no sólo en el medio ambiente, sino también en la salud humana, son los colorantes. Esto se debe a que son de fácil identificación y tienen un efecto negativo en el mérito estético del agua y solubilidad de gases en lagos, ríos y otros cuerpos de agua³, además de ser altamente carcinógenos, mutagénicos y tóxicos^{31,32}.

Es así entonces que los colorantes son considerados contaminantes emergentes, estos son definidos como “Cualquier sustancia química sintética o natural o microorganismo que no se detecte comúnmente en el medio ambiente, pero que pueda entrar en él y causar efectos adversos ecológicos y/o para la salud”². En la Figura 7 se muestra cómo se producen las contaminaciones en las plantas textiles.

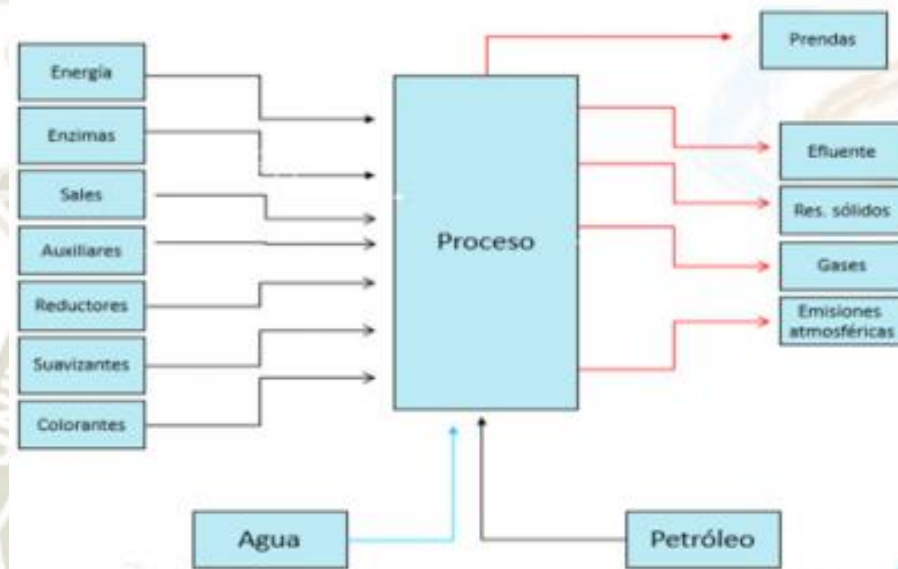


Figura 7. Contaminantes emitidos durante el proceso de teñido textil².

Los colorantes sintéticos, actualmente, empleados ampliamente la industria textil presentan compuestos tóxicos con alto peso molecular los cuales al estar presentes en los efluentes industriales y acumularse en lagos y bahías provocan⁸:

- La disminución en la luminosidad de las aguas
- La disminución de la actividad fotosintética
- Disminución del oxígeno disponible
- Aumento de carga orgánica La mayoría de los colorantes tiene una toxicidad baja a los peces y organismos acuáticos.

En los efluentes textiles se pueden encontrar metales como: arsénico, cadmio, cromo, cobalto, cobre, manganeso, mercurio, níquel, plata, titanio, zinc, estaño y plomo. Muchos de esos metales se generan durante el proceso de teñido. En la tabla 5 se muestran algunos metales presentes en diferentes clases de colorantes³³.

Tabla 3. Metales típicos encontrados en colorantes ³³.

Clase de Colorante	Metales
Directo	Cobre
Reactivo	Cobre y Níquel
Ácidos	Cobre, Cromo, Cobalto
Premetalizados	Cobre, Cromo, Cobalto
Mordante	Cromo

Dependiendo del tipo de colorante, se estima que del 2 al 50 % de estos compuestos se desechan en las aguas residuales y se consideran como contaminantes persistentes que no pueden removerse con los métodos convencionales de tratamiento, debido a su origen y las estructuras complejas que presentan^{5,34,35}. Además, colorantes tienen una pobre fijación sobre las telas y en el líquido que se descargan, se pueden encontrar concentraciones de colorante arriba de 1500 mg/L. Más del 90 % de los colorantes persisten después de los tratamientos con lodos activados y son recalcitrantes a la acción de depuración con dichos tratamientos³⁴.

Las estructuras químicas de las moléculas de colorantes resisten la exposición solar o el ataque químico, por lo que, en la mayoría de los casos, resultan también resistentes a la degradación microbiana³⁶. Se ha demostrado que ciertos colorantes azo pueden ser carcinogénicos y mutagénicos, además de que sus productos de degradación pueden resultar más tóxicos¹⁶. Las aminas aromáticas que se generan de la ruptura del enlace azo son comúnmente conocidas por su potencial carcinógeno³⁷.

Se ha reportado el efecto tóxico de efluentes textiles en hígado y testículos de ratas albinas, encontrando cambios en el contenido total de

lípidos y colesterol; lo que revela una disminución en la función testicular, además de alteraciones sobre la síntesis de proteínas sobre las células espermatogénicas³⁸. Así mismo se encontró la disminución de las proteínas en el hígado como resultado de la acción necrótica del efluente con colorantes. Dichos resultados fueron sustentados analizando los daños morfológicos observados en las células del hígado³⁹. Por otro lado también, se evaluó el posible riesgo genotóxico para los trabajadores de la industria textil, quienes se exponen a una amplia variedad de químicos como colorantes textiles, agentes blanqueadores, ácidos, álcalis y sales. En los resultados de su estudio, se revela que existe un riesgo de genotoxicidad en dichos trabajadores⁴⁰.

1.1.4.1. Normativas Legales

El agua es uno de los bienes más importantes y escasos que tienen las personas alrededor del mundo, nuestro país no es una excepción. Muchas de nuestras poblaciones se ven obligadas a beber de fuentes cuya calidad deja mucho que desear y produce un sin fin de enfermedades a niños y adultos. El acceso al agua potable es una necesidad primaria y por lo tanto un derecho humano fundamental⁴¹.

Es por eso que se han promulgado regulaciones que obligan a las industrias a tratar con más atención al tema de contaminación ambiental. En el Perú, el D.S. N°021-2009 - Vivienda (Descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario), ha establecido los estándares de valores máximos admisibles (VMA) de los efluentes²; los cuales se definen como “aquel valor de la concentración de elementos, sustancias o parámetros físicos y/o químicos que caracterizan a un efluente No doméstico que va a ser descargado a la red de alcantarillado sanitario, que al ser excedido en sus parámetros aprobados causa daño inmediato”¹⁰. En la Tabla 3 y 4 se presentan los valores máximos admisibles de las descargas de aguas no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario.

Tabla 4. Anexo n°1. Valores Máximos Admisibles de las descargas de aguas no domésticas en el sistema de alcantarillado⁴¹.

Parámetro	VMA (ppm)
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	500
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	1000
Sólidos Suspendidos Totales	500
Aceites y Grasas	100

Tabla 5. Anexo n°2. Valores Máximos Admisibles de las descargas de aguas no domésticas en el sistema de alcantarillado⁴¹.

Parámetro	Unidad	VMA
Aluminio	ppm	10
Arsénico	ppm	0.5
Boro	ppm	4
Cadmio	ppm	0.2
Cianuro	ppm	1
Cobre	ppm	3
Cromo hexavalente	ppm	0.5
Cromo total	ppm	10
Magnesio	ppm	4
Mercurio	ppm	0.02
Níquel	ppm	4
Plomo	ppm	0.5
Sulfatos	ppm	1000
Sulfuros	ppm	5
Zinc	ppm	10
Nitrógeno amoniacal	ppm	80
pH	unidad	6 - 9
Sólidos sedimentables	mL/L/h	8.5
Temperatura	°C	<35

1.2 TRATAMIENTOS UTILIZADOS PARA DECOLORACIÓN DE EFLUENTE TEXTIL

1.2.1 Métodos físicos

1.2.1.1 Adsorción

Esta tecnología es considerada una de las tecnologías más efectivas y probadas con un potencial de aplicación para el tratamiento de aguas residuales. La adsorción es un fenómeno rápido de separación del adsorbato de la fase acuosa o gaseosa a la fase sólida⁴². Las técnicas de adsorción se han vuelto populares recientemente debido a su eficiencia en la eliminación de contaminantes. La decoloración por ejemplo, es el resultado de dos mecanismos de adsorción e intercambio iónico, y está influenciada por factores fisicoquímicos como la interacción entre el colorante y el adsorbente, el área de superficie del adsorbente, el tamaño de las partículas, la temperatura, el pH y el tiempo de contacto⁴³.

Ha habido muchos ejemplos de adsorbentes de bajo costo hechos de materiales de desecho, para la eliminación de colorantes y materia orgánica coloreada en medios acuosos. Dentro de ellos se encuentran las cortezas, cáscara de arroz, carbón, bentoxita, arcilla y desechos de algodón, con el propósito de adsorber moléculas de tinte; demostrándose que la arcilla natural, la médula de bagazo y el maíz son los más efectivos⁴⁴. Hay varios materiales por los cuales se puede llevar a cabo la adsorción, algunos de ellos se analizan a continuación:

- **Carbón activado**

El carbón activado es el método más utilizado para eliminar el colorante por adsorción. Éste tiene una capacidad de eliminación de color alta cuando se introduce en una etapa de filtración separada. Existe una tasa alta de eliminación de colorantes catiónicos y ácidos; y moderada para tintes de azufre, dispersos, directos y reactivos. Las capacidades de adsorción del carbón activado también dependerán de la carga superficial

del adsorbente en contacto con el agua; para el carbón, la carga superficial será neutral, por lo que predominará la adsorción física⁴⁵.

- **Astillas de madera**

Las astillas de madera muestran una buena capacidad de adsorción para tintes ácidos; sin embargo, debido a su dureza, requieren tiempos de contacto más largos⁴⁶. La madera dura y el aserrín han demostrado ser buenos adsorbentes para los colorantes orgánicos polares. Según los estudios de cinética y el proceso de difusión para la eliminación del color utilizando madera como adsorbente han demostrado ser una metodología efectiva de tratamiento post biológico⁴⁴. La madera que ha adsorbido el colorante normalmente se quema para generar energía; aunque se puede también utilizar el potencial de fermentación de las astillas de madera adsorbidas por tinte⁴⁵.

1.2.2 Métodos químicos

1.2.2.1 Proceso oxidativo

La oxidación es el proceso de decoloración química más comúnmente utilizado debido a su manejo simple. Los colorantes son resistentes a las condiciones de oxidación moderadas; por lo tanto, la eliminación adecuada del color debe lograrse con agentes oxidantes más potentes como cloro, ozono, reactivos de Fenton, UV/peróxido, UV/ozono u otras técnicas o combinaciones de oxidación⁴⁷. La oxidación química elimina el tinte del efluente que contiene el tinte por oxidación, lo que resulta en la escisión del anillo aromático de las moléculas de tinte⁴.

- **Ozonización**

El ozono es un muy buen agente oxidante debido a su alta inestabilidad en comparación con el Cloro o el Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2). Puede oxidar selectivamente enlaces insaturados y estructuras aromáticas. La oxidación por ozono llevará a la degradación de hidrocarburos clorados,

fenoles, pesticidas e hidrocarburos aromáticos⁴⁸. El ozono puede reaccionar tanto en vías directas como indirectas. Las vías directas involucran a la propia molécula de ozono como aceptor de electrones. Los iones de hidróxido (presentes en concentraciones suficientes a niveles de pH superiores a 7–8) catalizan la auto descomposición del ozono en radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) en soluciones acuosas⁴⁷. Los radicales hidroxilo son oxidantes no selectivos muy fuertes que reaccionan con químicos orgánicos e inorgánicos con constantes de velocidad hasta 109 veces más altas que el ozono; por consiguiente, a pH bajo, el ozono puede atacar eficientemente los enlaces cromóforos insaturados en una molécula de colorante a través de reacciones directas. A un pH más alto, las reacciones indirectas del ozono pueden conducir a un proceso menos eficiente por la oxidación indiscriminada de todas las partes de la molécula de tinte, además de otros eliminadores en solución⁴⁸.

○ **Oxidación electroquímica**

El tratamiento electroquímico de las aguas residuales coloreadas se considera uno de los procesos avanzados y un método potencialmente poderoso de control de la contaminación, que ofrece una alta eficiencia de eliminación. Los procesos electroquímicos generalmente tienen un requisito de temperatura más bajo en comparación con otros tratamientos no electroquímicos y, por lo tanto, no requieren productos químicos adicionales⁴⁹. El equipo y la operación requeridos son generalmente simples. Los controles son fáciles y los reactores electroquímicos son compactos y evitan la producción de subproductos no deseados. El principal agente oxidante en el proceso electroquímico es el ión hipoclorito o el ácido hipocloroso producido a partir de los iones cloruro presentes en la naturaleza. Los radicales hidroxilo u otras especies reactivas también participan en la oxidación electroquímica de los compuestos orgánicos⁴⁹. El proceso sería relativamente no específico, es decir, aplicable a una variedad de contaminantes. Esta oxidación

electroquímica se puede lograr directa o indirectamente en el ánodo, o indirectamente usando reactivos económicos generados anódicamente apropiados. Los metabolitos de descomposición generalmente no son peligrosos, por lo que es seguro que las aguas residuales tratadas se devuelvan a las vías fluviales⁵⁰. El método electroquímico que se desarrolló a mediados de la década de 1990 se ha aplicado con éxito para tratar varias aguas residuales, es decir, lixiviados de rellenos sanitarios, contaminantes orgánicos refractarios que incluyen lignina, EDTA, aguas residuales que contienen contaminantes orgánicos poliaromáticos, efluentes de la curtiduría y aguas residuales de tinte textil⁵¹. El método electroquímico de oxidación para la eliminación de color es más eficiente para el tratamiento de aguas residuales de tinte textil para la etapa de tintura que para las etapas de tintura y acabado total. Durante el teñido, la reducción de color es aproximadamente del 100% con solo 6 minutos de electrólisis⁵².

- **Coagulación y Precipitación**

Las sales metálicas hidrolizantes de hierro y aluminio se usan ampliamente como coagulantes primarios para promover la formación de agregados en las aguas residuales y reducir la concentración de colorantes y otros compuestos orgánicos disueltos. El corto tiempo de detención y el bajo costo de capital hacen que la coagulación química sea una técnica ampliamente utilizada. El alto costo de los productos químicos para la precipitación, así como para los ajustes de pH, los problemas asociados con el desagüe y la eliminación del lodo generado, y la alta concentración de niveles de cationes residuales que quedan en el sobrenadante son algunas de las limitaciones de este método. Se investiga el tratamiento con productos químicos como sulfato de aluminio, sulfato ferroso y férrico, cloruro férrico, cloruro cálcico, sulfato de cobre, etc., ya sea solo o en combinación para la eliminación del color de los residuos de colorantes individuales, así como los residuos de fábrica de compuestos. Estos

estudios indican la viabilidad de la coagulación / precipitación química para la eliminación del color y sugieren que la eliminación del color se logra mediante la agregación / precipitación y la adsorción de sustancias colorantes en las especies de coagulantes polinucleares y en bandadas hidratadas⁵³. La literatura contiene informes sobre el uso de varios copolímeros como Pentaetileno, hexamina y dicloruro de etilendieno como floculante para la decoloración de los efluentes colorantes.

El mecanismo de eliminación se rige por el hecho de que la mayor parte del área de la superficie de los poros existe en poros de 10 a 1000 nm y los copolímeros tienen la ventaja de un gran diámetro de poro hasta el orden de 400 nm, lo que mejora el proceso de adsorción en flóculos⁵³.

1.2.3 Métodos Biológicos

1.2.3.1 Decoloración por hongos

La biodecoloración de aguas residuales usando hongos de pudrición blanca han sido reportados desde principios de la década de 1980⁵⁴. *P. chrysosporium* probó y decoloró una serie de otros colorantes a diversas concentraciones, particularmente cuando el alcohol veratryl estaba presente en el medio. Se cree que el alcohol veratryl estimula la actividad de la ligninasa, que parece estar relacionada con la decoloración⁵⁵. Por otro lado, la biomasa del hongo mucoraleano, *Rhizomucor pusillus*, se examinó como un adsorbente de color de un efluente de la planta de cloro. Se observó una fuerte adsorción de color en las primeras horas de tratamiento, eliminando alrededor del 43 - 48 % del color después de 8 h⁵⁶. Se piensa que la quitina y las fracciones residuales de la pared celular están involucradas en el mecanismo de eliminación de color del efluente *Rhizomucor pusillus*⁴⁵. Otro hongo de pudrición blanca es *Thelephora sp*; ésta se usó para la decoloración de colorantes azoicos tales como naranja G (50 µM), rojo congo (50 µM) y negro amido 10B (25 µM). La decoloración con el hongo fue 33.3, 97.1 y 98.8 % para naranja G, rojo congo y negro de amido 10B, respectivamente⁵⁷.

1.2.3.2 Decoloración por algas

Existe una cantidad limitada de estudios disponibles sobre el uso de algas para decoloración. Sin embargo, se reportó una decoloración del efluente blanqueado del molino kraft por algas, en el cual los cultivos de algas puras y mixtas eliminaron 50 - 70% de color dentro de los tres meses de incubación y el patrón de reducción de color mostró una fase de velocidad de eliminación rápida seguida de una fase de velocidad de eliminación decreciente⁴². La eliminación del color por las algas se debe tres mecanismos de acción, en los que se asimilan los cromóforos para la producción de biomasa y la transformación de CO₂ y H₂O. Varias especies de *Chlorella andoschillatoria* fueron capaces de degradar los colorantes azoicos a sus aminas aromáticas y de metabolizar aún más las aminas aromáticas en compuestos orgánicos simples o CO₂. Algunos incluso fueron capaces de utilizar algunos colorantes azoicos como su única fuente de carbono y nitrógeno⁵⁸.

1.2.3.3 Decoloración por bacterias

Existen numerosas bacterias capaces de decoloración de colorantes⁴⁶. Los esfuerzos para aislar cultivos bacterianos capaces de degradar los colorantes azoicos comenzaron con *Bacillus subtilis*, seguidos de *Aeromonas hydrophilia*, y *Bacillus cereus*, demostrándose que cultivos mixtos de bacterias de una amplia variedad de hábitats decoloran los cromóforos unidos a los enlaces diazo de la molécula de colorante^{3,36}. Además, se reportó también que la decoloración de una mezcla de colorantes por bacterias anaerobias es más efectiva usando células de crecimiento libre o biopelículas en diversos materiales de soporte⁴⁵. Investigaciones posteriores utilizando microbios mesófilicos y termófilos mostraron su capacidad para degradar y decolorar los tintes^{30,45}. Sin embargo, existe un inconveniente al requerir de un proceso de fermentación, y es que se limita la aplicabilidad de estas tecnologías para

hacer frente a un mayor volumen de efluentes coloreados. Es por eso que en la actualidad se está dando un enfoque biotecnológico para la eliminación del color con varias estrategias para la reducción de los tintes solubles en agua de las aguas residuales de teñido textil⁵⁹.

1.3 BIORREACTOR DE LECHO MÓVIL CON BIOPELÍCULA (MBBR)

Los desafíos asociados con el tratamiento de aguas residuales, como la reducción de los costos de energía, los requisitos cada vez más estrictos de efluentes y el uso limitado de la tierra para futuras plantas de tratamiento, han llevado a un mayor uso de tecnologías innovadoras y eficientes. Solo las industrias de agua y aguas residuales consumen más del 3 % de la electricidad total en los EE. UU. y más del 1 % en el Reino Unido cada año⁶⁰. Las tecnologías basadas en biopelículas para el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales se desarrollaron para superar varias desventajas que enfrentan los sistemas convencionales basados en flóculos y, a menudo, producen una mayor calidad del efluente⁶¹. Una de esas tecnologías es el sistema de reactor de lecho móvil con biopelícula.

El biorreactor de lecho móvil con biopelícula o también conocido por sus siglas en inglés MBBR (*Moving Bed BioReactor*), fue desarrollado por primera vez en Noruega, terminando los años de 1980 y comenzando los años de 1990⁶². Existen diferentes tecnologías que utilizan el sistema de biopelículas; sin embargo, muchos de ellos presentan dificultades que se vieron solucionadas al aparecer el sistema MBBR. Por ejemplo, los filtros por goteo tienen deficiencias en cuanto a efectividad y volumen; o por otro lado, los reactores de cama fluidizada muestran inestabilidad hidráulica, etc^{62,63}. Es así, que el biorreactor de lecho móvil con biopelícula fue diseñado para solucionar estos problemas, siendo un sistema de fácil manejo, sin pérdida de biomasa, o dependencia de temperatura, resultando en un proceso inherentemente estable y resistente a altas cargas orgánicas e hidráulicas⁶⁴.

El uso del sistema MBBR tiene muchas ventajas, entre ellas están: la reducción del tamaño del reactor, ya que el empleo de soportes brinda una alta superficie específica para el crecimiento de la biomasa; flexibilidad para modificar la

superficie específica en función del porcentaje de soportes empleado, ausencia de recirculación de fangos evitando la formación de esponjamiento filamentoso, sencillez en la operación y control del proceso, reducción de los atascamientos y operación a cargas elevadas, puede alcanzar la nitrificación debido al crecimiento de nitrificadores, puede trabajar a temperaturas extremas, entre otros^{65,66}. Por otro lado, muchos investigadores han demostrado que este tipo de tecnología trae otras ventajas tales como alta concentración de biomasa, alta carga de demanda química de Oxígeno (DQO), y gran tolerancia a las variaciones de carga⁶⁴.

Entonces, se puede definir al Biorreactor de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR) como una unidad biológica de tratamiento altamente efectivo, desarrollado bajo el principio del proceso de lodos activados y biofiltros⁶³. Su base es el crecimiento de biomasa en forma de biopelículas adheridas a soportes de plástico, mantenidos en constante movimiento dentro del biorreactor debido al uso de agitadores mecánicos en caso de necesitar condiciones anaerobias o anóxicas; o difusores de aire, en caso de necesitar condiciones aerobias⁶⁶ como se muestra en la Figura 8.

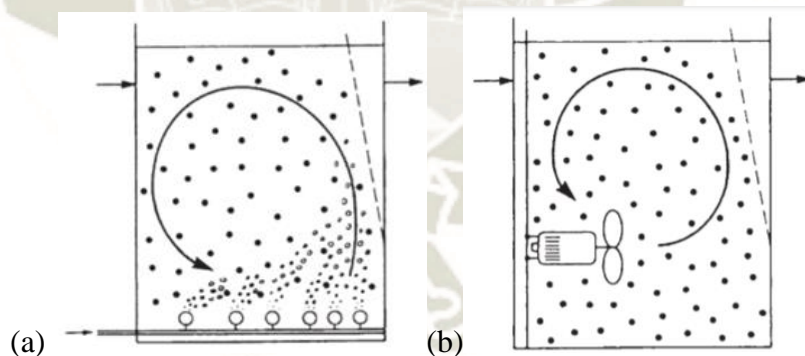


Figura 8. (a) Sistema MBBR con agitación aerobia. (b) Sistema MBBR con agitación anaerobia o anóxica⁶⁶

En este tipo de reactores, se utiliza todo el volumen del tanque para el crecimiento de biomasa y no necesita ningún reciclaje de lodos. Sin embargo, la relación de llenado de los soportes en esta tecnología debe ser menor al 70 %, no obstante, puede ser ajustado de acuerdo a la preferencia^{60,64,66}, y esto se debe a que la

suspensión de soportes necesita moverse libremente⁶². Además, este sistema trabaja bajo diferentes condiciones operacionales y es usualmente utilizado para el tratamiento de aguas residuales industriales tales como las provenientes de la industria de papel, quesos, lácteos, refinerías, mataderos, avícolas, aguas fenólicas, y aguas urbanas municipales^{63,66}. Por otro lado, se ha utilizado también los MBBR con operación tipo batch para el tratamiento biológico de remoción de fósforo, eliminación de materia orgánica, nitrificación y eliminación de nitrógeno^{63,65}.

1.3.1 Soportes

Los soportes utilizados pueden ser de diferentes materiales, incluyendo polietileno, plástico, esponja de poliuretano, carbón activado granular, etc.⁶⁶ y son variables en forma, tal como se muestra en la Figura 9 ya que su diseño tiene como propósito favorecer el movimiento y permisividad al flujo de agua a través y en torno a ellos⁶⁵. La naturaleza y constante agitación de los soportes da lugar el desarrollo de una biopelícula muy delgada y uniformemente distribuida que permite el transporte de sustrato y oxígeno a la superficie de la biomasa adherida; además, el roce entre ellos mismos hace que ésta se mantenga delgada, creciendo entonces, en su mayoría en el interior de los soportes^{64,65}.

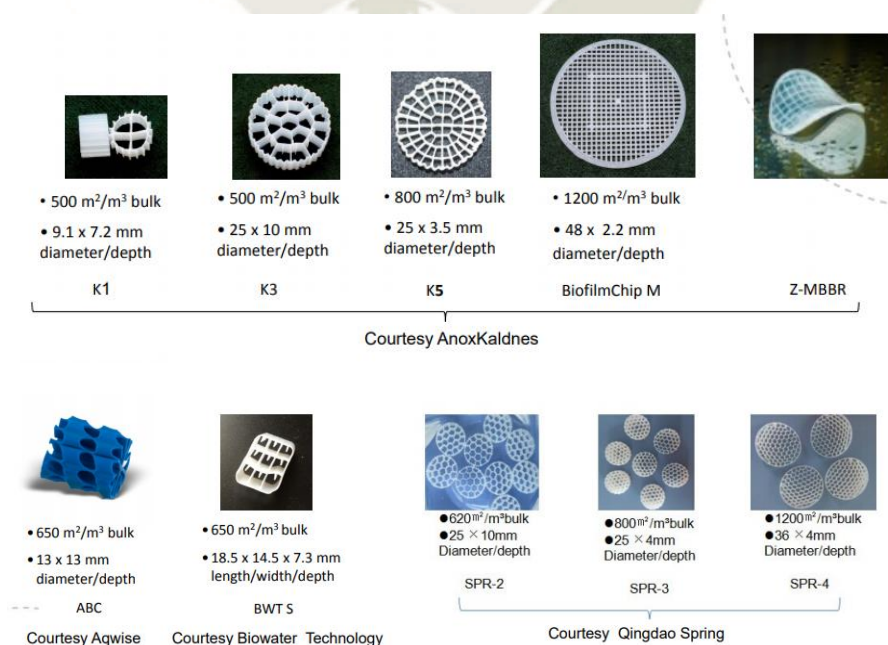


Figura 9. Tipos y características de soportes utilizados en el sistema MBBR⁶²

1.3.2 Biopelículas

El establecimiento y desarrollo de una biopelícula ideal es parte integral del proceso MBBR, que utiliza microorganismos basados tanto en biopelículas como en flóculos. Los portadores suspendidos se agregan a los reactores para retener los organismos de crecimiento lento a pesar del bajo tiempo de retención generalmente incurrido en los MBBR⁶³. Se considera que la clave para la formación de biopelículas para una operación MBBR exitosa está relacionada con la estructura de la comunidad microbiana y la funcionalidad de los organismos que se desarrollan en la superficie de los portadores⁶⁷. Como explica Safwat (2018)⁶⁶, en su trabajo titulado *Performance of moving bed reactor using effective microorganisms*, “usualmente el MBBR es inoculado con lodos activados debido a que es rico en microorganismos, para formar la biopelícula en la superficie de los soportes”; sin embargo, pueden utilizarse cualquier clase de microorganismos.

Por lo tanto, una biopelícula es la biomasa adherida a una superficie dada en la donde la absorción de nutrientes y el crecimiento microbiano se facilita⁶⁴. La superficie de adherencia es un material inerte donde se fija la biopelícula, y su formación depende de las características del material utilizado y de factores físicos y químicos que afectan la adhesión de los microorganismos como⁶⁸:

- a) Cargas electrostáticas: La carga eléctrica en la superficie de un microorganismo, está dada por la disociación de radicales amino, fosfato y por el pH del medio. Se considera que la célula microbiana en agua con un pH neutro o cercano tiene una carga superficial negativa: una fuerza electrostática actuará entre la célula y una superficie con carga positiva permitiendo una fácil adhesión.
- b) Afinidad por el agua (hidrofilia): Los materiales con superficie altamente hidrófoba tales como el polietileno, poliamida y poliestireno atraen fácilmente microorganismos que son hidrófobos: ya que sabemos que dos sustancias ya sean hidrófobas o hidrófilas se atraen. Dichos materiales plásticos atraen eficazmente organismos hidrofóbicos.

c) Rugosidad, porosidad del material y velocidad de flujo: ésta última puede retrasar la adhesión primaria de los microorganismos colonizadores. Los poros en el material permiten el establecimiento de las poblaciones microbianas y la protección de especies como los bacteriófagos.

El establecimiento de biopelícula se da en portadores que están diseñados para proporcionar una superficie protectora a la biopelícula y condiciones óptimas para el cultivo de microorganismos cuando están suspendidos libremente⁶⁹. Por naturaleza los microorganismos prefieren vivir adheridos como una forma de protección al medio circundante⁷⁰. Por lo tanto, una mayor área de superficie de los portadores proporcionará más sitios para que los microorganismos absorban nutrientes y crezcan. Con el tiempo, dichos microorganismos forman una matriz gelatinosa que la cual permite la adherencia de otros organismos y partículas⁶⁷. Existen dos tipos de adhesión: la reversible que está determinada por los factores fisicoquímicos expuestos anteriormente y la irreversible, que es obtenida a través de la excreción de exopolímeros (polisacáridos y glucoproteínas) que fijan con mayor fuerza los microorganismos a la superficie⁶⁸.

La biopelícula que crece sobre el material de soporte toma de la fase líquida sustancias como materia orgánica, nitrógeno, fósforo, oxígeno disuelto, y algunas otras sustancias, que reaccionan en la superficie de la biopelícula y luego, por difusión, son llevadas hacia el interior de la misma donde son metabolizadas. Las sustancias orgánicas de gran tamaño como la materia coloidal o materia en suspensión no pueden pasar por difusión al interior, sino que primero deben ser hidrolizadas a moléculas pequeñas en la superficie de la biopelícula y luego seguir un curso similar al de las sustancias de bajo peso molecular. Cuando alguno de los nutrientes se agota en el interior de la biopelícula, el metabolismo de los microorganismos se detiene de ese nivel hacia la base de la biopelícula, por lo que la sustancia que se agota primero determina la profundidad efectiva de la película y dicha sustancia se le llama “factor limitante”.

Algunos posibles factores limitantes que podemos mencionar son el oxígeno disuelto, la materia orgánica y nutrientes tales como el nitrógeno y fósforo.

Dependiendo de la afinidad que se presente entre los microorganismos que forman la biopelícula y la superficie del material varía la resistencia que presenta a factores mecánicos, como pueden ser los hidrodinámicos y el choque de las partículas entre ellas. Una vez que se cumplen las condiciones de afinidad entre la superficie del material y las bacterias, el crecimiento de la biopelícula se lleva a cabo por etapas que resultan de la interacción de una serie de procesos físicos, químicos y biológicos como son⁷¹:

- Colonización o inducción: Las bacterias u organismos presentes en el agua residual deben entrar en contacto con la superficie y adherirse a ella para realizar una colonización incipiente; la primera adhesión puede darse por secreción de polímeros o por fijación con flagelos.
- Adherencia: Una vez que algunos organismos logran adherirse a la superficie se inicia el desarrollo de las primeras capas de bacterias que utilizan mecanismos para garantizar su adherencia y la de las siguientes generaciones. Por lo general este proceso lo logra una sola especie de rápido crecimiento que forma una película delgada cubriendo toda la superficie.
- Oportunismo: Al existir una primera película y la consecuente matriz gelatinosa, otros organismos de más lento crecimiento que pueden o no producir sustancias que permiten su adhesión, tienen la oportunidad de encontrar acomodo aprovechando la primera película o utilizarla como soporte para sus actividades de depredación.
- Estabilización: Se alcanza esta fase cuando están presentes todas las especies (equilibrio trófico). Desde el punto de vista ecológico el tiempo de maduración es que el sistema biológico o biocenosis requiere para que se establezcan las relaciones entre los diferentes microorganismos y el número de individuos de cada grupo, no cambie con respecto al tiempo.

1.4 *Saccharomyces cerevisiae*

1.4.1 Generalidades

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos unicelulares. Se conocen hasta la actualidad 39 géneros y 350 especies, incluyendo especies patógenas para plantas y animales, así como otras especies de gran utilidad^{72,73}. Las levaduras son organismos eucariotas con gran diversidad respecto a su tamaño, forma y color. Dentro de sus características se encuentran: la capacidad de fermentación de azúcares, y el uso de determinadas fuentes de nitrógeno, como los nitratos. Sus células son generalmente ovaladas, pero también pueden encontrarse en forma esférica, cilíndrica o elíptica. Su tamaño es mayor al de las bacterias, con un diámetro que puede variar entre 2 a 200 μm . Se reproducen por fisión binaria o gemación y algunas pueden ser dimórficas o bifásicas y crecen como micelio bajo condiciones ambientales especiales. Son resistentes a antibióticos, sulfamidas y otros agentes antibacterianos de forma natural. Se conoce la secuencia completa de su genoma y se mantiene en constante revisión, lo que ha permitido la manipulación genética de los casi 6600 genes que codifican el genoma de levadura^{72,73}.

Dentro de las levaduras más estudiadas en el mundo se encuentra la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Ésta puede ser considerada el microorganismo más ampliamente utilizado por el hombre a través del tiempo, a pesar de que no se tuviera plena conciencia de su participación en la elaboración de alimentos como el pan o las bebidas alcohólicas como la cerveza o el vino. Su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza)⁷³. Con el objeto de producir una nueva célula, todos los compuestos presentes en la célula se deben incrementar. La célula de levadura tiene alrededor del 75 – 80 % de agua. El contenido de otros materiales es usualmente expresado como porcentaje de la materia seca remanente. Ésta consiste en: 5 % P_2O_5 ; 3 % K_2O ; Carbohidratos: 40 % (glucógenos, betaglucanos, etc); proteínas 64 %, peptonas 10 %, aminoácidos 8 %, Lípidos 1 % - 2 %⁷⁴. En la Figura 10 se muestra una imagen de la levadura:

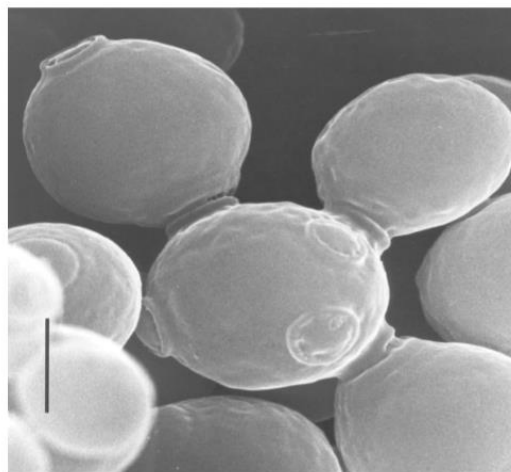


Figura 10. Micrografía de las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a mil aumentos. La barra representa 5 mm⁷².

La *Saccharomyces cerevisiae* tiene cinco fases de crecimiento bien establecidas cuando se cultiva en medios líquidos con glucosa como fuente de carbono: lag, logarítmica, cambio diáuxico, postdiáuxica y estacionaria. La fase lag es un periodo de adaptación en el cual la célula se prepara para dividirse. Durante la fase logarítmica las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y llevan a cabo un metabolismo fermentativo, aún en condiciones aerobias, del que se produce etanol. Al disminuir la concentración de glucosa, las células atraviesan por el cambio diáuxico, un periodo breve de tiempo en el cual no hay división, y la célula cambia de un metabolismo fermentativo a uno respiratorio. En la fase postdiáuxica las células usan como fuente de carbono el etanol producido durante la fase logarítmica e incrementan su resistencia al estrés gradualmente; en tanto que la fase estacionaria se presenta cuando los nutrientes del medio se han agotado y no hay división celular. En esta fase, las células acumulan carbohidratos de reserva como trehalosa y glucógeno, alcanzan el máximo nivel de resistencia a estrés y su pared celular se vuelve más gruesa y resistente a la digestión por liticasa⁷⁵.

Factores a tener en cuenta para el crecimiento y desarrollo de la *Saccharomyces cerevisiae*:

- Presión osmótica: La levadura se nutre a través de un proceso puramente osmótico, por eso es importante evitar medios hipertónicos o hipotónicos para evitar la plasmoptisis y plasmólisis.
- Temperatura: Las altas temperaturas pueden causar la reducción de la biomasa, como resultado de una disminución en el contenido de proteínas, ARN; ADN y aminoácidos libres, además de inducir a la rigidez de la membrana celular. Por otro lado, temperaturas muy bajas provocan un estado de latencia en la célula, deteniendo su desarrollo.
- Dsecación: Uno de las principales causas que inhiben las actividades y desarrollo de los microorganismos.
- Luz: Todos aquellos microorganismos que carezcan de clorofila, o cualquier otro pigmento que les permita usar la energía de las radiaciones en el proceso de fotosíntesis, son sensibles a la luz.
- pH: La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5. Sin embargo, tienen la ventaja de soportar, medios más ácidos, que otros microorganismos, lo que ayuda en los procesos industriales para mantener el medio controlado de bacterias que puedan competir por el sustrato⁷³.

1.4.2 Mecanismo de acción

Existen diferentes métodos para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con colorantes. Dentro de estos se encuentran los métodos fisicoquímicos como filtraciones por membrana o procesos fotoquímicos¹⁷. Sin embargo, estas tecnologías tienden a tener costos elevados y no son siempre

amigables con el medio ambiente. Por lo tanto, se ha acudido a los métodos biológicos de decoloración, tales como: biosorción por biomasa microbiana o métodos enzimáticos y biodegradación aerobia o anaerobia ^{17,31}.

- En el proceso de biosorción, la biomasa producida logra la decoloración por saturación y posterior biosorción del colorante sobre las células, ocurriendo esto con o sin degradación del contaminante. En este proceso están involucrados varios procesos como: la adsorción, el intercambio iónico y la unión covalente con los sitios biosorptivos de los microorganismos, incluidos grupos carboxilo, hidroxilo, sulfhidrilo, amino y fosfato. El proceso de biosorción puede ocurrir en biomasa viva o muerta ^{17,76}.
- La biodegradación por otro lado es el proceso por el cual las sustancias orgánicas se descomponen en compuestos más pequeños gracias a enzimas producidas por microorganismos, ésta ocurre cuando las especies pueden decolorar y mineralizar los colorantes textiles reduciendo, por ejemplo, los enlaces azo de los tintes. La velocidad de degradación depende de numerosos factores como el pH, temperatura, nutrientes, especificidad enzimática por el sustrato, etc^{17,77}.
- Finalmente, la degradación enzimática sucede cuando las enzimas causan reacciones químicas sin ser consumidas en la reacción. A través de procesos bioquímicos, éstas ocasionan la decoloración de colorantes ⁷⁷. Esto puede ser debido a la retención física del tinte en la biomasa o de su transformación bioquímica a través del metabolismo celular. Existen enzimas extracelulares como las lactasas y peroxidasas que tienen la habilidad de degradar colorantes y otros compuestos xenobióticos¹⁷.

Diferentes microorganismos, tales como bacterias, levaduras, algas y hongos son capaces de remover diferentes clases de colorantes; la interacción entre estos y los colorantes depende de las propiedades químicas de todas las reacciones⁷⁸. Las levaduras tienen muchas ventajas comparadas con las bacterias y los hongos

filamentosos ya que son un mejor material biosorbente para la remoción de colorantes reactivos debido a su naturaleza unicelular y alta tasa de crecimiento; pueden ser fácilmente cultivadas en medios de cultivo económicos, y son una fuente fácilmente disponible de biomasa que tiene el potencial de bioremediación de desechos a diferentes valores de pH. Además, se pueden adaptar y crecer en varias condiciones extremas de pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes, así como altas concentraciones de contaminantes³¹.

Por consiguiente, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha demostrado ser capaz de biorremediar el colorante negro reactivo encontrado en el efluente de industria textil. Su capacidad biosorbente está ligada a la composición de su pared celular; ésta involucra los grupos que contienen nitrógeno en los grupos peptidomano, peptidoglucano o los grupos activos en la superficie de las células, tales como polisacáridos ácidos, lípidos, aminoácidos y otros componentes celulares de los microorganismos^{79,80}. Dentro de los factores que afectan la eficiencia de biosorción se encuentra la concentración de colorante. Éste es un parámetro importante en la eficiencia de remoción de color. La concentración inicial provee una fuerza impulsora importante para superar la resistencia de transferencia de masa del colorante entre la fase acuosa y la fase sólida. Entonces, una concentración inicial alta puede mejorar el proceso de adsorción⁸¹.

Por otro lado, la adsorción de colorantes depende también de la química de los colorantes utilizados y de la capacidad de unión de la biomasa que tienen. La superficie de *Saccharomyces cerevisiae* tiene polímeros con muchos grupos funcionales diferentes como, carboxilo, hidroxilo, amino y fosfato. Cuando la superficie de la pared celular de la levadura se protona y adquiere carga neta positiva y esto aumenta la unión de los colorantes aniónicos, como los colorantes reactivos, a la superficie del biosorbente⁸².

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Lugar de Ejecución

- Universidad Católica de Santa María, Pabellón F, laboratorios F408, F402, F401

2.1.2 Material Biológico

- *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.3 Reactivos Químicos

- Ácido Sulfúrico concentrado, PA, suministrado por UCSM
- Cloruro de Bario, PA, marca DIPROQUIM, suministrado por UCSM
- Dicromato de Potasio, PA, marca Movilab, suministrado por UCSM
- Sulfato de Mercurio, PA, marca SOLUTEST, suministrado por UCSM
- Sulfato de Plata, PA, marca CDH, suministrado por UCSM
- Colorante Negro Reactivo *Novacron black W-NN*
- Caldo de Cultivo Sabouraud, marca DIPROQUIM
- Solución fisiológica salina estéril 0,9 %, marca B. Braun
- Hipoclorito de Sodio 2,5 %, marca Clorox
- Etanol 70 %, marca Jenfarma
- Agua destilada/desionizada

2.1.4 Material de vidrio

- Tubos de ensayo de vidrio pequeños
- Vaso de Precipitado 50, 100, 250 mL
- Probeta graduada 50, 100 mL
- Pipeta graduada 0.5, 1, 2, 5, 10 mL
- Matraces 25, 100, 250 mL
- Baguetas

- 3 Frascos de borosilicato autoclavable de 1 L con tapa
- Varilla de 1 m de 6 mm de diámetro
- Bureta 10 mL
- Beaker 50 mL, 1 L
- Balones aforados 1 L
- Tubos de ensayo con tapa rosca

2.1.5 Material de Laboratorio

- Tubos Eppendorf
- Papel de filtro
- Puntas azules y amarillas para micropipeta
- Propipeta
- Tubos Falcon

2.1.6 Instrumentos y Equipos

- Campana Extractora marca ESCO, modelo EFA-6UDRCW-8
- Refrigeradora marca Samsung, modelo RSAJHS2/RS1K5*/RS55K5*
- Shaker orbital marca MRC
- Autoclave marca BOECO, modelo YX-18LDJ
- Balanza analítica marca Sartorius, modelo Entris 224-1S
- Micropipeta de 20, 200, 1000 μ L marca CAPP
- Espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Scientific, modelo Evolution 201
- Colorímetro marca Hach, modelo DR900
- Baño María marca KertLab, modelo CDK-S28
- Centrífuga marca Hettich, modelo Rotofix 32^a
- Microcentrífuga refrigerada marca Hanil, modelo Smart R17
- Horno Mufla marca ThermConcept, modelo KLE 09/11
- Microscopio Trinocular marca Euromax iSCOPE, modelo IS.1153-PLPH
- Taladro de banca marca Bauker, modelo BD130F
- Bomba de aire marca SOBO, modelo SB-108

- Bomba Dosificadora marca WALCHEM/IWAKI, modelo EJ-B11VCUR
- Difusores de aire
- Mangueras de 0,5 cm y 0,6 mm de diámetro
- Filtros EPA
- Jeringas de 10 mL
- Cajas térmicas (coolers)
- Soportes Kaldnes K3

2.2 METODOLOGÍA

2.2.1 Evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en un medio sintético con colorante

2.2.1.1 Evaluación de la cinética microbiana

Se obtuvo la cepa pura de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de un paquete de levadura instantánea industrial seca de marca “Mauripan”. La cepa fue activada en un matraz de 250 mL con 150 mL de caldo de cultivo Sabouraud, cuya composición es: peptona de caseína (5 g/L), peptona de carne (5 g/L), y dextrosa (20 g/L)⁸⁰. Luego, fue puesto en un shaker orbital a 180 rpm, 28 °C por 24 horas³⁰.

A continuación, se elaboró la escala de McFarland como se detalla a continuación: Primero se prepararon las soluciones de H₂SO₄ al 1 % y BaCl₂ al 1.175 % en matraces de 500 y 50 mL respectivamente. Posteriormente, se prepararon las disoluciones para un volumen final de 10 mL siguiendo la Tabla 6 descrita a continuación. Finalmente, se midieron las absorbancias de cada tubo a una longitud de onda de 625 nm en el espectrofotómetro UV-Vis y se realizó una curva de calibración⁸¹. Se realizaron las pruebas por triplicado.

Tabla 6. Tabla de medidas para la escala McFarland ⁸¹

Estándar	H ₂ SO ₄ al 1%, mL	BaCl ₂ al 1.175%, mL	Concentración, cel/mL	Absorbancia
0	0	0	0	0
0.5	9.95	0.05	1.5 x 10 ⁸	0.103
1	9.9	0.1	3 x 10 ⁸	0.206
2	9.8	0.2	6 x 10 ⁸	0.407
3	9.7	0.3	9 x 10 ⁸	0.569
4	9.6	0.4	1.2 x 10 ⁹	0.774
5	9.5	0.5	1.5 x 10 ⁹	1.011
6	9.4	0.6	1.8 x 10 ⁹	1.125
7	9.3	0.7	2.1 x 10 ⁹	1.320
8	9.2	0.8	2.4 x 10 ⁹	1.472
9	9.1	0.9	2.7 x 10 ⁹	1.526
10	9	1	3 x 10 ⁹	1.702

Posteriormente, se hizo un conteo de la levadura activada utilizando la cámara de Neubauer Improved para determinar la concentración inicial de la cepa. Seguidamente, se hicieron diluciones hasta obtener una concentración aproximada de 1.5 x 10⁸ células/mL en comparación con el estándar 0.5 de la escala de McFarland.

A continuación, se inoculó la cepa al caldo Sabouraud con 50 mg/mL de colorante para su adaptación y estudio de cinética microbiana. Se llevó el cultivo a incubación en un shaker orbital a 35 °C y se tomaron alícuotas de 3 mL a tiempos de 0; 0.5; 1; 2; 4; 6; 10; 14; 20; 26; 30; 34; 38 horas, hasta alcanzar su fase estacionaria. Las alícuotas fueron tomadas por triplicado. Se determinó el modelamiento cinético empleando la ecuación de Malthus mostrada en la ecuación 1 ⁸²; además se determinó también el tiempo de duplicación de la cepa, mostrado en la ecuación 2 ⁸³ para calcular cuánto tiempo le tomaría a la población bacteriana duplicarse.

$$X = X_0 \cdot \exp. (\mu t) \quad (1)$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (2)$$

Donde:

X = Concentración de biomasa

X₀ = Concentración inicial de biomasa

μ = Velocidad específica de crecimiento

t = Tiempo

t_d = Tiempo de duplicación

Para medir el crecimiento de la levadura, se llevaron las muestras a centrifugación a 12700 rpm, por 15 minutos a 4 °C; luego, se separó el sobrenadante del precipitado y se lavó el último con una solución de NaCl al 0.85 % y se resuspendió utilizando la misma solución. Finalmente, se llevó la resuspensión al espectrofotómetro UV-Vis ajustándolo a un blanco de 0.5 según los estándares de la escala de McFarland ²⁹.

Por último, se utilizó la ecuación de la curva obtenida para hallar las concentraciones en células/mL de la levadura y observar así su cinética microbiana.

2.2.2 Evaluación de la capacidad de remoción del colorante empleando *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.2.1 Curva de calibración del colorante.

Primeramente, se realizó un barrido espectral del colorante donde se determinó la longitud de onda a la cual deben ser leídas las muestras. Luego, se prepararon cuatro soluciones stock del colorante a concentraciones 20, 40, 60 y 80 mg/mL y un blanco de agua destilada; éstas fueron leídas al espectrofotómetro a una longitud de onda de 597 nm, según el barrido espectral mencionado anteriormente. En último

lugar, se elaboró la curva de calibración. Una vez realizado el gráfico de calibración, se midió la concentración de colorante en el efluente problema.

2.2.2.2 Evaluación de la remoción

Se midieron las absorbancias de los sobrenadantes obtenidos en la etapa 2.2.1.1, es así que se calcula la concentración de colorante residual después de los diferentes tiempos de contacto de la levadura con el analito. Las absorbancias obtenidas de cada tubo se compararon con los valores obtenidos en la curva de calibración del colorante para conocer su concentración. Luego se utilizaron estos datos para construir otro gráfico que muestre la disminución de la concentración del colorante e indique la capacidad de remoción del colorante de *Saccharomyces cerevisiae* ³⁰.

2.2.3 Diseño y construcción del Biorreactor de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR).

Primero, se realizó el diseño del biorreactor de lecho móvil con biopelícula (MBBR) y se adquirieron los materiales. La tapa fue un tapón de jebe en el cual se estableció la ubicación de los siguientes puertos: entrada de aire, salida de aire, punto de alimentación, punto de toma de muestra, como se muestra en la Figura 12.

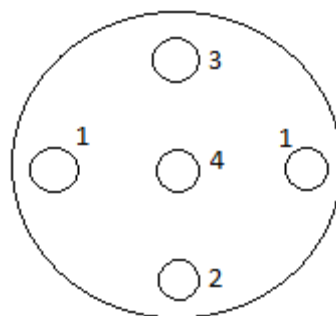


Figura 11. Configuración de los puertos ubicados en la tapa del vessel. (1) Entrada de aire. (2) Entrada del efluente textil. (3) Salida de aire. (4) Puerto de toma de muestra.

El vessel fue constituido por un frasco de borosilicato de 1 L de capacidad, al cual se le implementaron los siguientes sistemas, tal como se muestra en la Figura 13:

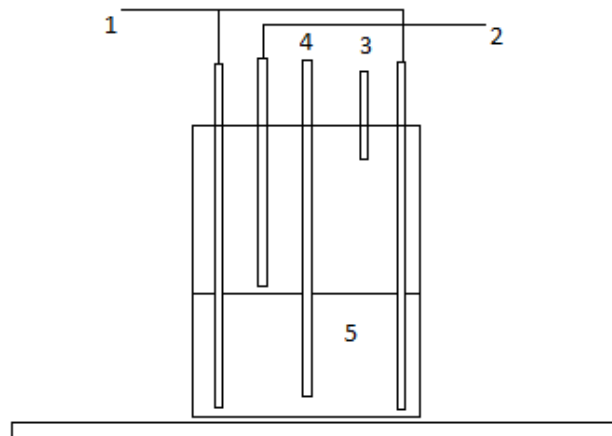


Figura 12. Configuración interna del biorreactor. (1) Entrada de aire. (2) Entrada del efluente textil. (3) Salida de aire. (4) Puerto de toma de muestra. (5) Lecho móvil – soportes Kaldness K3.

- Sistema de aireación: Se colocaron dos puertos de ingreso de aire, cada uno con dos difusores ubicados en la parte inferior del reactor y alimentados por una bomba de aire cada uno.
- Sistema de alimentación: Se utilizó un sistema de bombeo, una red de tuberías y un sistema de almacenamiento de entrada.
- Sistema de lecho móvil: Se utilizó soportes de polietileno de alta densidad marca Kaldnes K3, con forma cilíndrica, de superficie corrugada, con interior de soporte cruzado de 25 mm de diámetro, 10 mm de altura y 500 m²/m³ de área de superficie específica.
- Sistema de enchaquetado: Se utilizó un equipo de Baño María, el cual se mantuvo a 37°C.

Luego, se procedió a ensamblar y unir los sistemas del biorreactor.

- Instalación del sistema de aireación: Se instalaron las tuberías y conexiones para el ingreso de aire procedente de las bombas. Las mangueras utilizadas

fueron de plástico con un diámetro de 0.6 mm y estuvieron conectadas a varillas de vidrio de 0.6 mm de diámetro que se colocaron dentro del vessel. A la parte final de estas varillas se le adicionaron los difusores de aire.

- Instalación del sistema de alimentación: Se alimentó el biorreactor utilizando bombas dosificadoras que succionaban el efluente textil de un tanque hacia el interior del biorreactor. El flujo de ingreso del efluente fue de: 0.16 L/min. Las mangueras que conectaban las bombas con el biorreactor eran de plástico con un diámetro de 0.5 cm y éstas, a su vez, estuvieron conectadas también a una varilla de vidrio que se encontraría dentro del vessel.
- Puesta en funcionamiento del biorreactor: Todos los elementos de los sistemas del biorreactor fueron autoclavados a 121°C, 15 bar, por 15 minutos. A continuación, se realizó el ensamblaje del sistema dentro de una cámara de flujo laminar, para luego dar inicio a todos los sistemas acoplados. La configuración del sistema se muestra en la Figura 14.

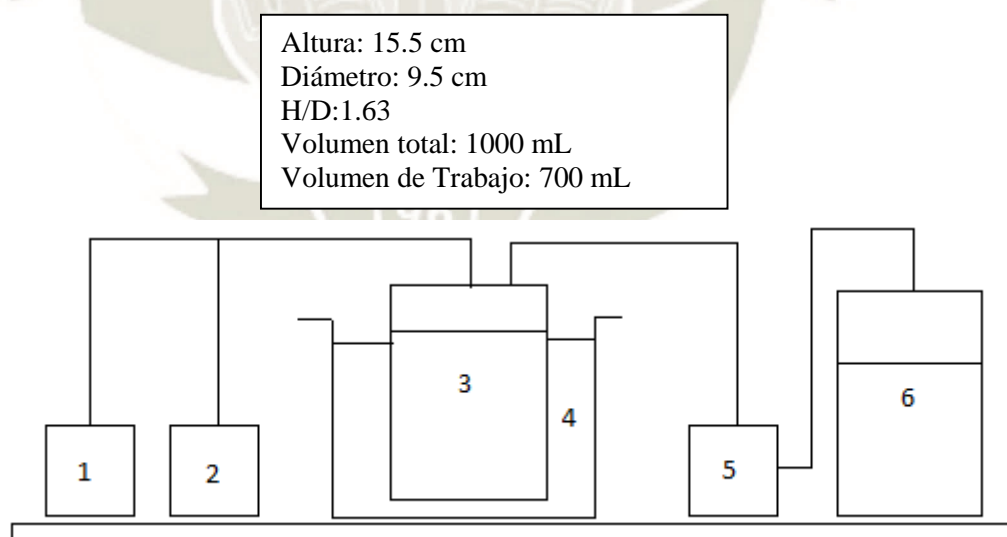


Figura 13. Configuración del sistema experimental. (1 y 2) Bombas de aire. (3) Biorreactor MBBR. (4) Enchaquetado de Baño María. (5) Bomba dosificadora. (6) Tanque de almacenamiento de efluente textil.

Al finalizar el periodo de operación del sistema MBBR, se desacopló. Los soportes y elementos que lo conformaron fueron lavados de manera mecánica, con agua potable y los residuos generados fueron almacenados de forma segura.

2.2.4 Evaluación del funcionamiento de los sistemas MBBR utilizando efluente textil.

2.2.4.1 Obtención de muestras de efluente procedente del sector industrial textil.

Se extrajeron muestras de efluente de una empresa textil ubicada en la ciudad de Arequipa siguiendo el Protocolo de Monitoreo de la Calidad Sanitaria de los Recursos Hídricos Superficiales, establecido por la Dirección General de Salud Ambiental e Inocuidad Alimentaria (DIGESA)⁸⁴.

Se utilizaron cuatro frascos de plástico de boca ancha de 1 L de capacidad, limpios. En un frasco se adicionó H_2SO_4 y este fue designado para la determinación de DQO. En los tres frascos restantes sólo se agregó el efluente textil. Al tomar la muestra se llenaron completamente los frascos e inmediatamente fueron cubiertos. Las muestras recolectadas fueron rotuladas y conservadas en cajas térmicas (Coolers) y luego puestos en refrigeración a 4°C hasta su uso.

2.2.4.2 Obtención de biomasa

Para la formación de la biopelícula en sistema MBBR, se utilizaron soportes de polietileno de alta densidad marca Kaldnes K3, los cuales fueron inicialmente pesados y luego inoculados con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* adaptada al colorante.

Los soportes fueron colocados en tres matraces de 1 L cada uno, cada matraz contenía 700 mL de caldo de cultivo Sabouraud suplementado con 50 mg/mL del colorante previamente autoclavado. La cantidad de soportes colocados en cada matraz fue de 20, 40 y 60 % respectivamente. Los

matraces fueron sellados con parafilm, a los cuales se les adicionó mangueras de plástico para el ingreso de aire para la oxigenación y recirculación de los soportes, y una salida de aire para controlar la presión generada. Todos los elementos fueron esterilizados antes de ser ensamblados y puestos en marcha.

El tiempo considerado para la generación de biomasa fue de 4 semanas, luego los soportes con la biopelícula formada se traspasaron al sistema MBBR construido bajo condiciones estériles.

Después de haber transcurrido el tiempo de funcionamiento de los MBBR, se tomaron los soportes y se pesaron para determinar la densidad de biomasa generada.

2.2.4.3 Puesta en marcha del sistema MBBR

Se utilizó el efluente de la industria textil como alimentación del sistema MBBR. Se tomó una alícuota inicial de 10 mL al tiempo 0 y luego a las 1, 2, 5, 24, 34 horas de tiempo de funcionamiento. El muestreo se realizó por triplicado.

2.2.4.4 Evaluación de DQO

Para la determinación de DQO, se utilizó 2.5 mL de la cada una de las alícuotas tomadas a los diferentes tiempos y se hizo la lectura utilizando el método colorimétrico especificados en los Standard Methods ⁸⁵.

Preparación de reactivos:

- a. Solución digestora: Se agregó 0.5108 g de $K_2Cr_2O_7$ previamente secado a 150 °C por 2 h; 8.35 mL de H_2SO_4 ; y 1.665 g de $HgSO_4$. Se disolvió, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se enrazó a 50 mL.
- b. Ácido Sulfúrico Reactivo: Se agregó 1.01 g de $AgSO_4$ en polvo a 100 mL de H_2SO_4 concentrado; se dejó un día para lograr su disolución.

Procedimiento:

Se agregó 1.5 mL de solución digestora, 3.5 mL de Ácido Sulfúrico Reactivo y 2.5 mL de la muestra problema a los tubos a utilizar. Las muestras se dejaron enfriar lentamente hasta alcanzar una temperatura ambiente para evitar la formación de precipitado. A continuación, se colocaron los tubos en un digestor a 150°C por 2 horas. Transcurrido el tiempo, las muestras se dejaron enfriar y una vez alcanzaron la temperatura ambiente, se midieron en el colorímetro a una longitud de onda de 600 nm. Se utilizó como blanco un tubo con la misma cantidad de reactivos, pero la muestra problema se reemplazó por agua destilada.

Luego de obtenidos los resultados, se realizaron los cálculos estadísticos utilizando el programa Microsoft Excel 2016. Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza al 95 % y se evaluaron los valores obtenidos en la disminución de DQO del efluente mediante los sistemas MBBR, para la cual se consideraron las siguientes hipótesis:

H0: Las medias obtenidas para cada biorreactor son iguales.

H1: Al menos dos medias obtenidas para cada biorreactor son distintas.

Se llevó a cabo la prueba de hipótesis para una variable, a través de la comparación de medias, para evaluar los niveles de DQO del efluente textil antes y después del tratamiento.

2.2.4.5 Evaluación de la remoción del colorante

Los tubos con las alícuotas tomadas durante el funcionamiento del biorreactor fueron llevados a centrifugación a 12700 rpm, por 15 minutos a 4 °C; en seguida, se separó el sobrenadante del precipitado y se leyó en el espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 597 nm para medir la concentración de colorante a los diferentes tiempos de funcionamiento.

Las absorbancias obtenidas de cada tubo fueron utilizadas para hacer una curva midiendo la eficiencia del sistema MBBR.

Luego de obtenidos los valores resultantes, se realizaron los cálculos estadísticos a través de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza al 95 % y se evaluaron los valores obtenidos en la remoción del colorante en cada sistema MBBR, para la cual se consideraron las siguientes hipótesis:

H0: Las medias obtenidas para cada biorreactor son iguales.

H1: Al menos dos medias obtenidas para cada biorreactor son distintas.

Se llevó a cabo la prueba de hipótesis para una variable, a través de la comparación de medias, para evaluar los niveles de colorante del efluente textil antes y después del tratamiento.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en un medio sintético con colorante

- Evaluación de la cinética microbiana

Se determinó que el inóculo inicial de *Saccharomyces cerevisiae* fue muy concentrado; por lo tanto, se hizo una dilución con factor 50 para obtener una concentración celular de 1.5×10^8 células/mL, la cual fue tomada como concentración celular inicial. En la Figura 15 se muestra una vista al microscopio de la levadura durante el conteo.

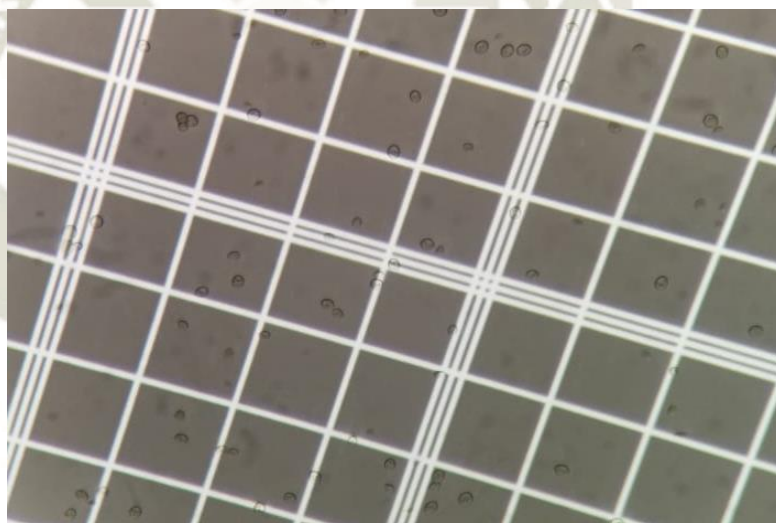


Figura 14. Vista al microscopio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con aumento 40X puesta en la cámara de Neubauer Improved.

En la Figura 16 se muestran las absorbancias obtenidas de las muestras estándar para obtener la concentración celular basadas en la escala de McFarland⁸¹. Con la recta de calibración se obtuvo un R^2 de 0.9914, lo que significa que los valores tienen un comportamiento lineal aceptable.

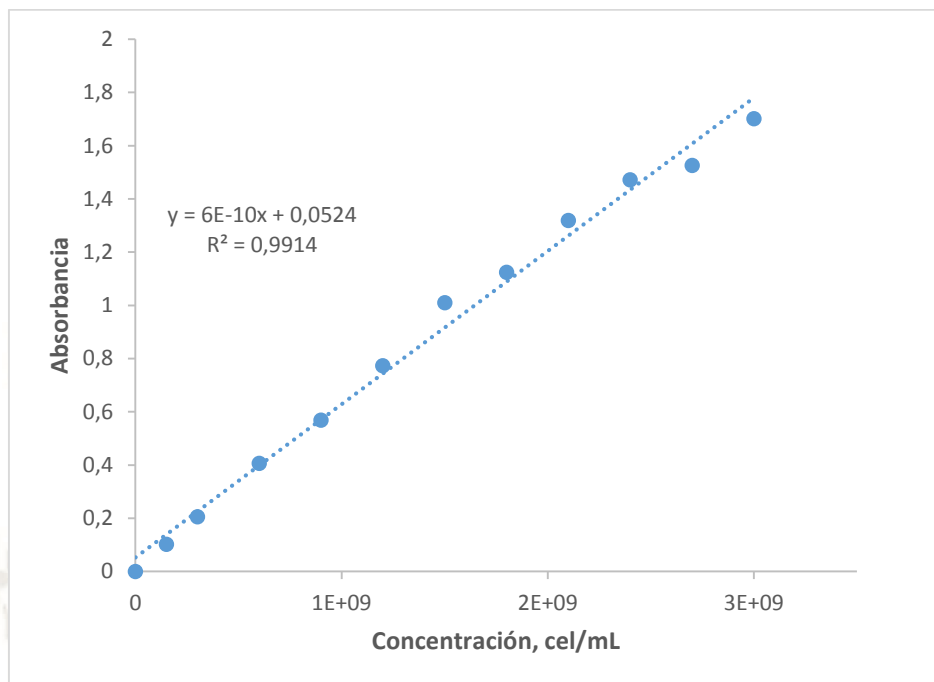


Figura 15. Recta de Calibración de la escala de McFarland

Por otro lado, en la Figura 17 se muestra el crecimiento celular de la levadura desde las 0 hasta las 38 horas. Se observa que la levadura pasó por una fase de adaptación al colorante durante las primeras 2 horas; luego entró en su fase exponencial hasta las 30 horas, para después entrar a su fase estacionaria hasta las 38 horas. Se determinó que tuvo una velocidad específica de crecimiento de $0.0798 \text{ cel/mL} \times \text{h}$, y su tiempo de duplicación fue de 8.686 horas. De Martin (2005)⁷⁴, reporta que *Saccharomyces cerevisiae* tiene cinco fases de crecimiento: La primera es la fase lag, en donde la levadura se adapta al medio en el que se encuentra. En seguida, entra en la fase exponencial, donde las células alcanzan su máxima velocidad de duplicación y se lleva a cabo un metabolismo fermentativo. Después, al disminuir la concentración de fuente de carbono en el medio, las células atraviesan por un cambio diáuxico, un tiempo en el cual no hay división celular; para luego entrar en la fase postdiáuxica, periodo en el cual las células utilizan el producto procedente de la fase exponencial como fuente de carbono. Finalmente, llega la fase estacionaria, momento en el cual los nutrientes en el medio se agotan y ya no hay más división celular.

Según Rocha (2011)(89), *Saccharomyces cerevisiae* cultivada en medio YPS (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona bacteriológica y 20 g/L de sacarosa)⁹⁰, tuvo una fase lag de 5 horas, luego una fase exponencial hasta las 20 horas, que es cuando inicia la fase estacionaria hasta las 35 horas de incubación. Reporta que la levadura tuvo una velocidad específica de 0.2332 cel/mL x h. Este comportamiento se da debido a que el medio YPS contiene nutrientes que benefician el crecimiento del microorganismo, resultando en una mayor producción de biomasa. Por el contrario, en la presente investigación, se observa que a pesar que la fase lag de la levadura fue más corta, la fase exponencial de la misma duró 10 horas más; esto se debe a la existencia del colorante en el medio utilizado, éste componente extraño ralentiza el crecimiento de la levadura. Mahmoud (2014)³⁰, reporta haber inoculado *Saccharomyces cerevisiae* en medio PBD suplementado con 100, 200, 300, 400, 500, 600 mg/mL de colorante. En sus resultados reporta mayor crecimiento a menores concentraciones de colorante; aseverando que la velocidad de crecimiento de la levadura se ve afectada por la existencia de colorante disuelto en el medio.

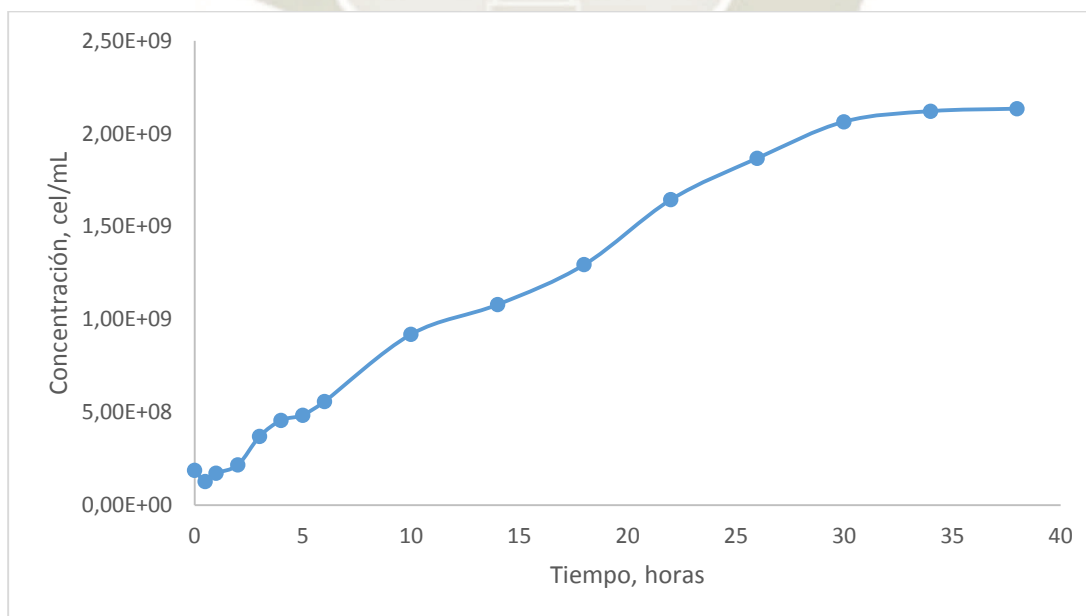


Figura 16. Curva de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en caldo de cultivo Sabouraud sintético suplementado con 50 mg/mL de colorante negro reactivo.

3.2 Evaluación de la capacidad de remoción del colorante empleando *Saccharomyces cerevisiae*.

- Curva de calibración del colorante

Se observa en la Figura 18 la recta de calibración del colorante negro reactivo con las absorbancias obtenidas a 20, 40, 60 y 80 mg/mL. Se obtuvo un R^2 de 1, lo que significa que la curva tiene un comportamiento lineal admisible.

De acuerdo a la ley de Lambert Beer, la absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración (91). Por lo tanto, los resultados obtenidos nos indican que las absorbancias de 0.511; 1.014; 1.516; y 2.014 corresponden a las concentraciones de 20, 40, 60 y 80 mg/mL respectivamente; lo que en consecuencia concluye que cualquier solución que contenga el mismo analito, cuyas absorbancias estén dentro de los valores de 0 a 2.014 tendrán concentraciones conocidas.

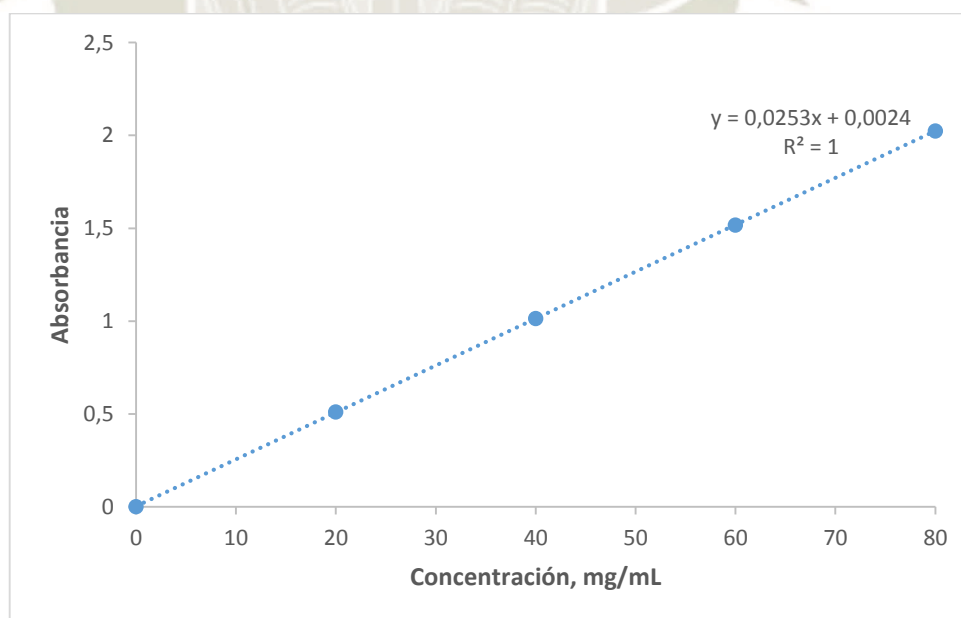


Figura 17. Recta de Calibración del colorante negro reactivo *Novacron – negro WNN*

- **Evaluación de la remoción**

Luego de la obtención de las absorbancias de las muestras y su comparación con la curva de calibración del colorante, se construye el grafico de disminución de la concentración del mismo en relación al tiempo mostrado en la Figura 19. Ésta señala que hubo un decaimiento exponencial de la concentración del colorante desde las 0 horas con una concentración inicial de 47.85 mg/mL hasta las 38 horas, terminando en una concentración de 10.93 mg/mL. Por lo tanto, se observa una reducción del colorante del 77.15 %. Según Mahmoud (2014)³⁰, *Saccharomyces cerevisiae* alcanza una capacidad de remoción de colorante azul de ramazol de 100 % en 1 hora cuando la concentración es de 100 mg/L, y una remoción de 88.3 % al mismo tiempo cuando la concentración es de 600 mg/L. En comparación con los resultados obtenidos, la cepa utilizada en esta investigación tardó más tiempo en remover el colorante del medio y tuvo una eficiencia de remoción menor. La explicación a este comportamiento según Jaramillo *et. al* (2018)⁷⁸, es que existe una mayor biorremediación de colorante a mayor concentración de levadura y habrá una menor biorremediación de colorante a menor concentración de levadura en el medio . Por lo tanto, la velocidad de remoción del colorante es proporcional a la concentración de colorante residual; lo que quiere decir que, si la concentración del colorante residual disminuye, la velocidad de biorremediación también disminuye.

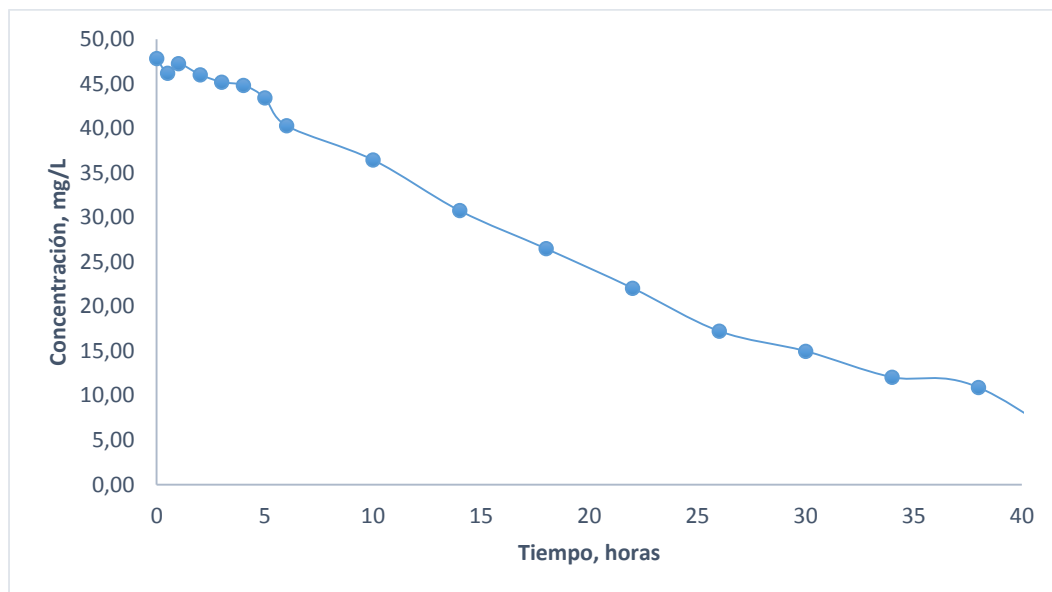


Figura 18. Curva de remoción del colorante negro reactivo *Novacron – negro WNN*

3.3 Diseño y construcción del Biorreactor de Lecho Móvil con Biopelícula (MBBR).

Los sistemas fueron dispuestos y puestos en marcha de acuerdo a las especificaciones del método que corresponde. En la Figura 20 se observa el arreglo de los sistemas, con los cuatro principales componentes: tanques de almacenamiento del efluente problema, el cual tuvo una capacidad de 1 L; bombas dosificadoras, las cuales funcionaron con un caudal de 0.16 L/min; los biorreactores MBBR propiamente dichos con los soportes de polietileno de alta densidad Kaldnes K3, conteniendo la biopelícula de levadura *Saccharomyces cerevisiae* adaptadas al colorante; finalmente, las bombas de aire que proporcionan la oxigenación de las levaduras y la recirculación de los soportes. En la Figura 21 se muestra la disposición de los puertos ubicados en la tapa del vessel, considerados los puntos de entrada de aire, toma de muestra, salida de aire y entrada de efluente. En la Tabla 7 se muestran los parámetros considerados para el diseño de los sistemas MBBR y en la Tabla 8 se muestran las características del soporte utilizado para el crecimiento de la biopelícula.

Tabla 7. Datos técnicos MBBR

Parámetro	Resultado
Volumen (L)	1
Caudal (L/min)	0.16
Dirección del flujo	Flujo ascendente

Tabla 8. Características del soporte Kaldnes K3

Material	Polietileno
Forma	Cilindro corrugado
Dimensiones	25 mm de diámetro / 10 mm de altura
Superficie específica	500 m ² /m ³

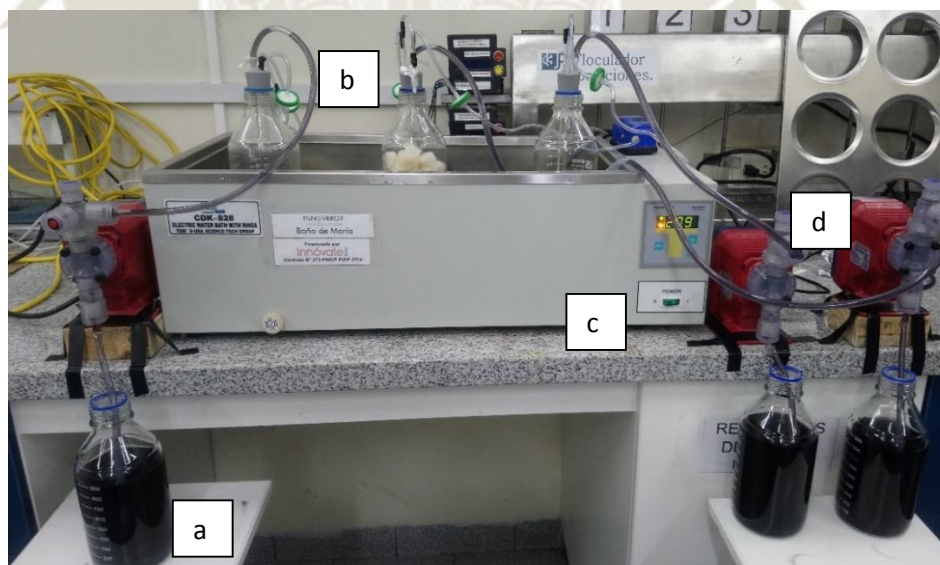


Figura 19. Vista frontal de los sistemas MBBR configurados para la remoción de colorante negro reactivo de efluente textil. (a) Tanque de almacenamiento de efluente. (b) Biorreactor. (c) Equipo de Baño María. (d) Bombas dosificadoras.

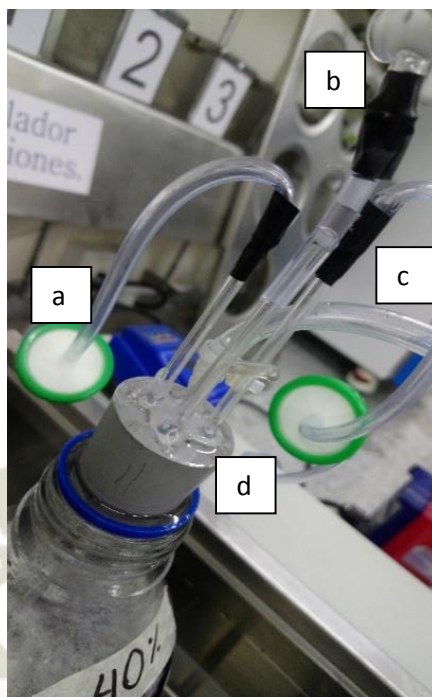


Figura 20. Disposición de los puertos ubicados en la tapa del biorreactor. (a) Entrada de aire. (b) Toma de muestra. (c) Entrada de efluente. (d) Salida de aire.

Tal como es explicado por Francis & Sosamony (2016)⁸⁶, en su investigación, ellos utilizaron el sistema MBBR para el tratamiento de aguas residuales pre-tratadas. En su diseño consideraron un vessel cilíndrico de vidrio acrílico con un volumen total de 11.25 L, una relación H/D de 3.33 cm. Este biorreactor contaba con un puerto de salida de aire en la parte superior lateral y un ingreso de aire en la parte inferior que actúa también como agitador de los soportes. Por otro lado, la proporción de llenado que ellos utilizaron fue de 70 % en relación al volumen del reactor y las características de los soportes fueron de 1.5 cm de diámetro interno, 2 cm de diámetro externo y 1,4 cm de altura. Éstos soportes fueron obtenidos cortando una tubería de una lavadora y eran de cloruro de polivinilo (PVC). Al comparar sus resultados con los obtenidos en la presente investigación, notamos que se consideraron los mismos parámetros con la única diferencia de la ubicación de los puertos. Esto se debe a que los requerimientos mínimos necesarios para hacer funcionar óptimamente un sistema MBBR son los mencionados. Sin embargo, se notó que el material utilizado para los soportes varió; no obstante, no se reportaron problemas en el crecimiento de la biopelícula, lo que

indica que el material del soporte no tiene un impacto significativo sobre el microorganismo a utilizar.

3.4 Evaluación del funcionamiento de los sistemas MBBR utilizando efluente textil

- Masa total de la biomasa:

En la Tabla 9 se muestra la densidad de la biopelícula formada en cada biorreactor por cantidad de soportes. Se observa que la densidad fue mayor en el biorreactor con mayor porcentaje de soportes, siendo el resultado de 5814.1 mg/L. Los resultados van disminuyendo proporcionalmente con la cantidad de soportes utilizados; para 40 % se obtuvo una biomasa de 3652.8 mg/L; finalmente el vessel con 20 % obtuvo 1048.7 mg/L. Según Lopez *et al.* (2012)⁶⁹, los microorganismos se adhieren a la superficie de los soportes; por consiguiente, a mayor cantidad de soportes, mayor cantidad de biomasa habrá. Por otro lado, de acuerdo a lo reportado por Francis & Sosamony (2016)⁷⁹, la proporción de llenado afecta el crecimiento de la biomasa en los soportes. Los autores reportan que, cuando la proporción de soportes es mayor a 80 % del volumen de reactor con los soportes, la eficiencia disminuye debido a que no hay una agitación adecuada. Por el contrario, cuando la proporción de llenado es menor que 40 %, la eficiencia de transferencia de oxígeno es pobre, por lo que la eficacia también decrece. En comparación con los resultados obtenidos, se evidencia una menor densidad de biopelícula formada cuando la proporción es menor, es decir de 20 %. Esto puede deberse a que la levadura no tiene suficiente superficie específica a la cual adherirse, por lo tanto, su crecimiento es limitado. Además, no hay una transferencia de oxígeno adecuada hacia el microorganismo, limitando su crecimiento también.

Por otra parte, se observa un mayor crecimiento cuando la proporción de llenado es de 60 %, y esto puede suceder porque existe una mayor superficie específica a la cual adherirse y porque hay una mejor agitación en el biorreactor, permitiendo la transferencia de oxígeno del medio a la levadura.

Tabla 9. Densidad de la biopelícula formada por proporción de llenado (mg/L).

Proporción de llenado, %	Densidad de la biopelícula formada, mg/L
20	1048.7
40	3652.8
60	5814.1

- **Evaluación de DQO:**

La Demanda Química de Oxígeno (DQO) es uno de los parámetros más utilizados en el control de calidad de aguas. Se define como la cantidad de oxidante químico que se necesita para oxidar los materiales contenidos en el agua y se expresa en mg de O_2/L^{95} . Por lo tanto, la DQO cuantifica la cantidad de materia orgánica total que puede ser oxidada ya sea biodegradable o no biodegradable, y se utiliza para establecer niveles de contaminación en muestras líquidas. Por ende, a mayor valor de DQO en una muestra, mayor serán los niveles de contaminación de la misma.

Según Kermani *et.al* (2008)⁶², el biorreactor de lecho móvil con biopelícula (MBBR) es efectivo para la eliminación de materia orgánica en plantas municipales de aguas residuales debido a los procesos biológicos que ocurren en la biopelícula, alcanzando una eficiencia de remoción de DQO de hasta 95.7 %. Entonces, de acuerdo a lo observado en la Figura 22, los valores de DQO en los diferentes biorreactores disminuyen con el transcurso del tiempo que éstos están en funcionamiento. En el biorreactor con 60 % de llenado hubo una disminución de los valores de 368 mg/L a la hora 0, hasta 117 mg/L a la hora 34, con porcentaje de eliminación de 68.21 %. Para el biorreactor con 40 % de llenado se obtuvieron resultados de 367 mg/L a la hora 0 y 102 mg/L a la hora 34, con un porcentaje de eliminación de 72.21 %. Finalmente, para el biorreactor con 20 % de llenado los resultados fueron los siguientes, 365 mg/L en la hora 0, hasta 147 mg/L en la hora 34, con un porcentaje de eliminación de 59.73 %. Concluyendo que la biopelícula de *Saccharomyces cerevisiae* formada tuvo un efecto positivo en la oxidación de la materia orgánica del efluente problema.

Por otro lado, Fang *et.al* (2014)³⁵ reporta que la existencia de colorante en la muestra afecta también la degradación oxidativa. Entonces, al ser los colorantes compuestos recalcitrantes a la degradación oxidativa, después de ser descompuestos a partes más pequeñas, éstas se hacen más fácilmente biodegradadas vía oxidación, llevando al incremento de los valores de DQO. No obstante, los microorganismos utilizados continúan consumiendo estas partes pequeñas hasta desaparecerlas casi totalmente, ocasionando la disminución de la DQO. Por consiguiente, esto nos indica que la presencia de colorantes en la muestra tiene un efecto en los valores reportados de DQO. Como se observa en este estudio, la Figura 22 muestra que los valores de DQO no disminuyeron significativamente en las horas 0, 1 y 2; sin embargo, con el transcurso del tiempo los valores bajaron hasta alcanzar valores de 68.21, 71.21 y 59.73 % respectivamente.

Finalmente, luego de realizar un Análisis de Varianza (ANOVA), se obtuvo un valor de p de 0.56, que es mayor a 0.05. Por lo tanto, queda demostrado que la hipótesis nula es verdadera, es decir, no existe diferencia significativa entre variables, como se muestra en el Anexo 3; lo que es consistente con los resultados expuestos por López *et. al* (2012)⁷⁰. En su estudio muestra que el porcentaje de remoción de DQO en sus tres sistemas MBBR con 20, 35 y 50 % de llenado de soportes, fue de 71.9 % para el primero y 75.3 % para los dos siguientes, no existiendo diferencia significativa tampoco.

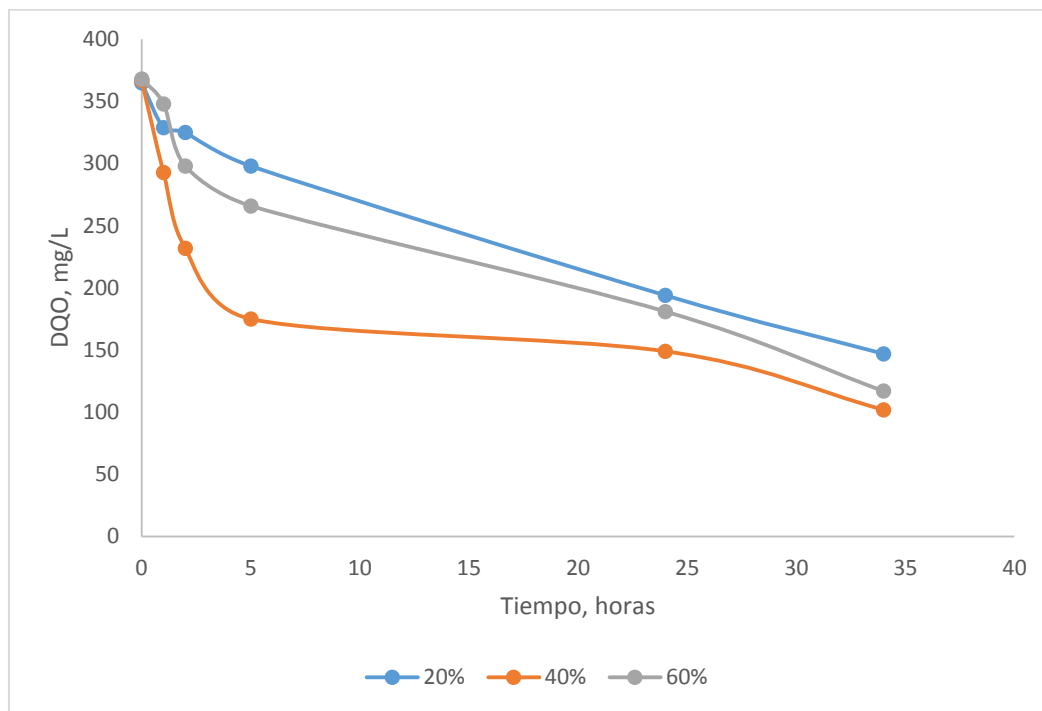


Figura 21. Curva de disminución de DQO en mg/L dependiendo del porcentaje de soportes utilizados.

- Evaluación de remoción de colorante

Las concentraciones de colorante para cada biorreactor a los diferentes tiempos se muestran en la Tabla 17 del Anexo 1. Se puede observar que el porcentaje de remoción para el biorreactor con 20 % de llenado es de 3.02 %; para el biorreactor con 40 % de llenado es de 20.30 %; finalmente, para el biorreactor con 60 % de llenado es de 5.85 %.

Se observa en la Figura 23 que la concentración del colorante no disminuye notablemente con ninguna de las proporciones de soportes, lo que se corrobora con el Análisis de Varianza (ANOVA) que muestra un valor probabilístico P de 0.06 que es mayor a 0.05 lo que los indica que no hay diferencia significativa entre los resultados mostrados en el Anexo 1.

Se asume que este fenómeno se debe a que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* fue adaptada sólo a un caldo de cultivo con el colorante y la composición del

efluente textil comprende otros componentes como detergentes, blanqueadores, etc. Por lo tanto, la cepa tuvo que pasar por un periodo de adaptación más largo, mostrando así, una menor remoción del colorante en el tiempo dado.

Además, según Mahmoud (2016)³⁰ el pH es un factor determinante en el crecimiento de la bacteria, siendo un pH óptimo para su desarrollo entre 2 a 5. Sin embargo, el pH no fue un parámetro considerado al momento de tratar el efluente textil, lo que puede explicar la poca efectividad de remoción del colorante por la cepa. Es así también que Jaramillo *et.al* (2018)⁷⁸ reporta que *Saccharomyces cerevisiae* tiene una cinética de crecimiento y remoción de colorante de 72 horas, por lo tanto, se asume que a un mayor tiempo de contacto de la cepa con el efluente, se hubiera evidenciado una mayor remoción del colorante.

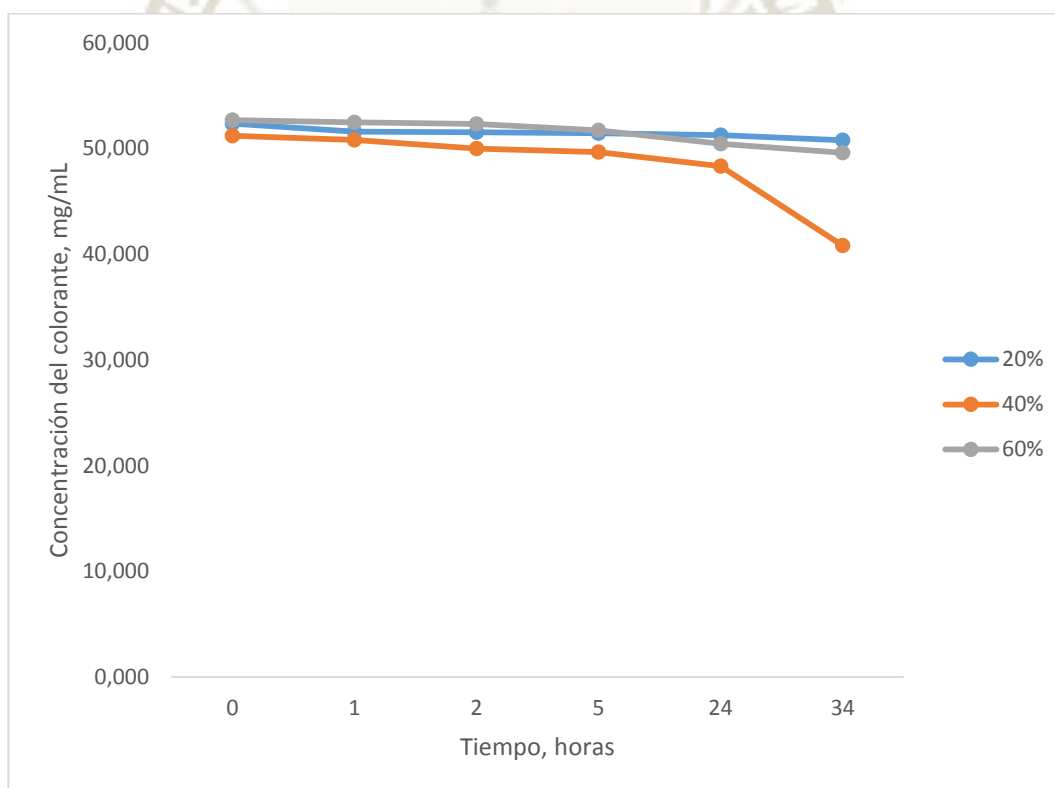


Figura 22. Curva de remoción de colorante en mg/mL a diferentes tiempos utilizando 20, 40 y 60 % de soportes por biorreactor

CONCLUSIONES

PRIMERA. La eficiencia de biodepuración de colorante en efluentes textiles utilizando *Saccharomyces cerevisiae* es significativamente similar en todos los sistemas MBBR estudiados, indistintamente de la proporción de llenado de soportes.

SEGUNDA. La cepa *Saccharomyces cerevisiae* tiene una cinética de crecimiento de 38 horas, con una velocidad específica de crecimiento de 0.0798 cel/mL x h y un tiempo de duplicación de 8.686 horas; en donde se identifica la fase lag de 2 horas; la fase exponencial de 30 horas.

TERCERA. La levadura logra un porcentaje de remoción del colorante negro reactivo del 77.15 %, alcanzando una concentración final de 10.93 mg/mL a las 38 horas de tiempo de contacto.

CUARTA. Se diseñó el biorreactor de lecho móvil con biopelícula de manera que los puertos de ingreso de aire consigan una aireación eficiente; un puerto de salida de aire para evitar la presión generada; un puerto de ingreso de efluente de manera constante con un caudal de 0.16 L/min y flujo ascendente; un puerto de toma de muestra para evaluar el avance del sistema MBBR; el uso de soportes de polietileno de alta densidad con una superficie específica de 500 m²/m³; y un tiempo de funcionamiento de 34 horas.

QUINTA. Se logró una densidad de biopelícula de 1047.7 mg/L a un 20 % de proporción de llenado del vessel; 3652.8 mg/L a un 40 % de llenado y un 5814.1 mg/L a un 60 % de llenado. Por otro lado, se observó que hubo una disminución de DQO de 59.73 % para el 20 %; 72.21 % para el 40 % y el 68.21 % para el 60%; sin embargo, no hubo una diferencia significativa entre las tres proporciones de llenado de soportes. Finalmente, se evidenció una remoción del colorante de 3.02 % con el 20 % de llenado; 20.3 % con el 40 % de llenado y 5.85 % con el 60 % de llenado. Se asume que estos resultados se deben a los agentes externos encontrados en el efluente problema que disminuyeron la eficacia de remoción.

RECOMENDACIONES

- Utilizar diferentes valores de pH y/o temperatura para la investigación de los valores óptimos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* para la biodepuración de colorantes textiles.
- Usar otros materiales, formas y/o tipos de soportes para la investigación del efecto de los mismos en el crecimiento óptimo de la biopelícula.
- Evaluar el efecto del tiempo de funcionamiento en el sistema MBBR para observar diferentes porcentajes de remoción de colorante y disminución de DQO en efluente textil.
- Emplear otros microorganismos tales como: bacterias, hongos de pudrición blanca o algas, como alternativa de biopelícula para la biodepuración de efluentes textiles.

BIBLIOGRAFÍA

1. United Nations. Emisiones de CO2 en América Latina y el Caribe. 13 Marzo. 2015;
2. Brañez, Marco;Gutierrez, Romulo;Perez, Ronald;Uribe, Carmen;Valle P. Pollution of aquatic environments generated by textile industry. 2018;5(23):129–44.
3. Miao Y. Biological remediation of dyes in textile effluent : a review on current treatment technologies. 1992;1–10.
4. Anjaneyulu Y, Sreedhara Chary N, Samuel Suman Raj D. Decolourization of industrial effluents - Available methods and emerging technologies - A review. Rev Environ Sci Biotechnol. 2005;4(4):245–73.
5. Kuhad RC, Sood N, Tripathi KK, Singh A, Ward OP. Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. Adv Appl Microbiol. 2004;56:185.
6. Orozco Romero KL. Biodegradación de colorante azul directo por consorcios bacterianos aislados de un efluente textil de Lima , Perú. Universidad Mayor de San Marcos; 2018.
7. Pereira Boitano JB. Control del Proceso de Teñido de las Fibras de Algodón. Universidad Nacional de Ingeniería; 2014.
8. Moreno Cueva MA. Producción limpia en tintorería de la fábrica textil La Bellota. Universidad Nacional de Ingeniería; 2006.
9. Ali NF, El-Mohamedy RSR. Microbial decolourization of textile waste water. J Saudi Chem Soc [Internet]. 2012;16(2):117–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2010.11.005>
10. Autoridad Nacional del Agua. Reglamento para el Otorgamiento de Autorizaciones de Vertimiento y Reuso de Aguas Residuales Tratadas [Internet]. Lima, Perú; 2013. Available from: http://www.ana.gob.pe/sites/default/files/normatividad/files/r.j.224_con_reglamento_autorizaciones_de_vertimientos_6_0.pdf

11. Sociedad Nacional de Industrias. Evolución de la Industria Manufacturera [Internet]. Perú; 2018. Available from: www.sni.org.pe
12. El Peruano. Sector Textil y confecciones exportó US\$ 1400 millones. 2019 Mar;
13. Ministerio de la Producción. Estudio de investigación del sector textil y confecciones. 1era Edición [Internet]. 2017 Dec; Available from: www.produce.gob.pe
14. Pérez V, Rodríguez C, Ingar B. Reporte Financiero Burkenroad Perú - Sector Textil del Perú. Luma, Perú; 2010.
15. Gurses A, Acikyildiz M, Gunes K, Gurses MS. Dyes and pigments: Their structure and properties. Dye Pigment. 2016;13–29.
16. Das A, Mishra S. Decolorization of Different Textile Azo Dyes using an Isolated Bacterium *Enterococcus durans* GM13. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2016;5(7):675–86.
17. González-Ramírez CA, Escalante-Lozada JA, Cortazar-Martinez A, Castro-Rosas J, Villagómez-Ibarra JR. Biotecnología Aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. Univ y Cienc. 2012;28(2):187–99.
18. Zhao X, Hardin IR. HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. Dye Pigment. 2007;73(3):322–5.
19. Holme I. TECHNOLOGY-Dyeing Cellulosic Fibres. Text Mag. 2004;31(2):8–13.
20. Taylor JA. Recent developments in reactive dyes. Rev Prog Color Relat Top. 2000;30:93–108.
21. Peñafiel S. Influencia del suavizado con bases de ácidos grasos en el cambio de matiz en tejidos algodón 100% tinturados con Colorantes Reactivos de baja reactividad. Universidad Técnica del Norte; 2011.
22. Khatri A, Hussain M, Mohsin M, White M. A review on developments in dyeing

- cotton fabrics with reactive dyes for reducing effluent pollution. *J Clean Prod* [Internet]. 2015;87:50–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2014.09.017>
23. Mohsin M, Rasheed A, Farooq A, Ashraf M, Shah A. Environment friendly finishing of sulphur, vat, direct and reactive dyed cotton fabric. *J Clean Prod*. 2013;53:341–7.
 24. Riva Juan A. Estudio de los colorantes Lanazol. Colorantes reactivos para lana. *Boletín del Inst Investig Text y Coop Ind* [Internet]. 1972;(52):21–9. Available from: <http://hdl.handle.net/2099/5996>
 25. Gordon S, Hsieh Y-L. "Cotton". 1st Edition. California, USA: Woodhead Publishing; 2007. 568 p.
 26. Khatri A. Use of biodegradable organic salts for pad-steam dyeing of cotton textiles with reactive dyes to improve process sustainability. *Int Proc Econ Dev Res*. 2011;18:84–9.
 27. Lewis DM, Broadbent PJ, Vo LTT. Covalent fixation of reactive dyes on cotton under neutral conditions. *AATCC Rev*. 2008;8(1):35–41.
 28. Heyna J. Reactive dyes containing vinylsulfonyl groups. *Angew Chemie Int Ed English*. 1963;2(1):20–3.
 29. Karim ME, Dhar K, Hossain MT. Decolorization of Textile Reactive Dyes by Bacterial Monoculture and Consortium Screened from Textile Dyeing Effluent. *J Genet Eng Biotechnol* [Internet]. 2018;16(2):375–80. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.02.005>
 30. Mahmoud MS. Decolorization of certain reactive dye from aqueous solution using Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain. *HBRC J* [Internet]. 2016;12(1):88–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hbrcj.2014.07.005>
 31. Mahmoud MS, Mostafa MK, Mohamed SA, Sobhy NA, Nasr M.
BIOREMEDIATION OF RED AZO DYE FROM AQUEOUS SOLUTIONS BY

ASPERGILLUS NIGER STRAIN ISOLATED FROM TEXTILE WASTEWATER.

Biochem Pharmacol [Internet]. 2016; Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.12.030>

32. Cortazar Martínez A, Coronel Olivares C, Escalante Lozada A, Gonzáles Ramírez C. Contaminación generada por colorantes de la industria textil. Vida Científica [Internet]. 2014;2(3). Available from: <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n3/e1.html>
33. Dias AA, Sampaio A, Bezerra RM. Environmental applications of fungal and plant systems: decolourisation of textile wastewater and related dyestuffs. In: Environmental Bioremediation Technologies. Springer; 2007. p. 445–63.
34. Dos Santos AB, Cervantes FJ, Van Lier JB. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. Bioresour Technol. 2007;98(12):2369–85.
35. Technology E. Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4BS by a microbial consortium. 2004;57:293–301.
36. Weisburger JH. Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. Mutat Res Mol Mech Mutagen. 2002;506:9–20.
37. Kwon J-H, Lee H-K, Kwon J-W, Kim K, Park E, Kang M-H, et al. Mutagenic activity of river water from a river near textile industrial complex in Korea. Environ Monit Assess. 2008;142(1–3):289–96.
38. Mathur N, Krishnatrey R, Sharma S, Sharma KP. Toxic effects of textile printing industry effluents on liver and testes of albino rats. Bull Environ Contam Toxicol. 2003;71(3):453–7.
39. Dönbak L, Rencüzoğullari E, Topaktas M, Sahin G. A biomonitoring study on the workers from textile dyeing plants. Russ J Genet. 2006;42(6):613–8.
40. Dirección General de Salud Ambiental - Ministerio de Salud. Reglamento de la

Calidad del Agua para Consumo Humano DS N 031-2010-SA. Lima, Peru; 2011.

41. Ministerio de Vivienda Construcción y Saneamiento. Valores Máximos Admisibles de las aguas residuales no domésticas [Internet]. Lima, Perú; 2009. Available from: http://www3.vivienda.gob.pe/direcciones/Documentos/DS_2009_021.pdf
42. Mohan SV, Karthikeyan J. Removal of diazo dye from aqueous phase by algae *Spirogyra* species. *Toxicol Environ Chem*. 2000;74(3-4):147-54.
43. Choy KKH, McKay G, Porter JF. Sorption of acid dyes from effluents using activated carbon. *Resour Conserv Recycl*. 1999;27(1-2):57-71.
44. Bousher A, Shen X, Edyvean RGJ. Removal of coloured organic matter by adsorption onto low-cost waste materials. *Water Res*. 1997;31(8):2084-92.
45. Robinson T, Chandran B, Nigam P. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes. *Enzyme Microb Technol*. 2001;29(8-9):575-9.
46. Nigam P, Armour G, Banat IM, Singh D, Marchant R. Physical removal of textile dyes from effluents and solid-state fermentation of dye-adsorbed agricultural residues. *Bioresour Technol*. 2000;72(3):219-26.
47. Staehelin J, Hoigne J. Decomposition of ozone in water: rate of initiation by hydroxide ions and hydrogen peroxide. *Environ Sci Technol*. 1982;16(10):676-81.
48. Adams CD, Gorg S. Effect of pH and gas-phase ozone concentration on the decolorization of common textile dyes. *J Environ Eng*. 2002;128(3):293-8.
49. Kim T-H, Park C, Lee J, Shin E-B, Kim S. Pilot scale treatment of textile wastewater by combined process (fluidized biofilm process-chemical coagulation-electrochemical oxidation). *Water Res*. 2002;36(16):3979-88.
50. Pelegrini R, Peralta-Zamora P, de Andrade AR, Reyes J, Duran N. Electrochemically assisted photocatalytic degradation of reactive dyes. *Appl Catal B, Environ*.

1999;22(2):83–90.

51. Panizza M, Bocca C, Cerisola G. Electrochemical treatment of wastewater containing polyaromatic organic pollutants. *Water Res.* 2000;34(9):2601–5.
52. Vlyssides AG, Papaioannou D, Loizidou M, Karlis PK, Zorpas AA. Testing an electrochemical method for treatment of textile dye wastewater. *Waste Manag.* 2000;20(7):569–74.
53. Alinsafi A, Khemis M, Pons M-N, Leclerc JP, Yaacoubi A, Benhammou A, et al. Electro-coagulation of reactive textile dyes and textile wastewater. *Chem Eng Process Process Intensif.* 2005;44(4):461–70.
54. Bajpai P, Mehna A, Bajpai PK. Decolorization of kraft bleach plant effluent with the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Process Biochem.* 1993;28(6):377–84.
55. Pazarlioglu NK, Urek RO, Ergun F. Biodecolourization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochem.* 2005;40(5):1923–9.
56. Knapp JS, Newby PS, Reece LP. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme Microb Technol.* 1995;17(7):664–8.
57. Selvam K, Swaminathan K, Chae K-S. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp. *Bioresour Technol.* 2003;88(2):115–9.
58. Jinqi L, Houtian L. Degradation of azo dyes by algae. *Environ Pollut.* 1992;75(3):273–8.
59. Chen K-C, Wu J-Y, Liou D-J, Hwang S-CJ. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *J Biotechnol.* 2003;101(1):57–68.
60. Sanabria Cubillos A, Pacheco Ojeda JD. Diseño y evaluación de un reactor biológico de lecho móvil de cargas secuenciales como alternativa de tratamiento para un vertimiento procedente de una industria farmacéutica. Universidad de La Salle;

2019.

61. Piechna P, Zubrowska-Sudoł M. Respirometric activity of activated sludge and biofilm in IFAS-MBBR system. *J Ecol Eng.* 2017;18(4):145–51.
62. Ødegaard H. Innovations in wastewater treatment: The moving bed biofilm process. *Water Sci Technol.* 2006;53(9):17–33.
63. Kermani M, Bina B, Movahedian H, Amin MM, Nikaein M. Application of moving bed biofilm process for biological organics and nutrients removal from municipal wastewater. *Am J Environ Sci.* 2008;4(6):675–82.
64. Leyva-Díaz JC, Martín-Pascual J, Poyatos JM. Moving bed biofilm reactor to treat wastewater. *Int J Environ Sci Technol.* 2017;14(4):881–910.
65. Álvarez M, Mavares D. Reactores Biopelícula De Lecho Móvil: Estado Del Arte. *Rev Digit Investig y Postgrado del Vicerrectorado Barquisimeto la UNEXPO* [Internet]. 2015;5(3):895–913. Available from: <http://redip.bqto.unexpo.edu.ve>.
66. Safwat SM. Performance of moving bed biofilm reactor using effective microorganisms. *J Clean Prod.* 2018;185:723–31.
67. Biswas K, Taylor MW, Turner SJ. Successional development of biofilms in moving bed biofilm reactor (MBBR) systems treating municipal wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(3):1429–40.
68. Piña Mondragón S. Decoloración biológica de colorante azul directo 2 en un filtro anaerobio/aerobio. Universidad Nacional Autónoma de México; 2007.
69. Rusten B, Eikebrokk B, Ulgenes Y, Lygren E. Design and operations of the Kaldnes moving bed biofilm reactors. *Aquac Eng.* 2006;34(3):322–31.
70. Lopez-Lopez C, Martín-Pascual J, González-Martínez A, Calderón K, González-López J, Hontoria E, et al. Influence of filling ratio and carrier type on organic matter removal in a moving bed biofilm reactor with pretreatment of

- electrocoagulation in wastewater treatment. J Environ Sci Heal - Part A Toxic/Hazardous Subst Environ Eng. 2012;47(12):1759–67.
71. González MS. Biopelículas Aerobias en Tratamientos de Aguas Residuales. Venezuela; 1998.
 72. Altamirano Cahuancama CA. Optimización de un Método para la Producción de Biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* empleada en la etapa de Fermentación del Mosto de Cerveza , desde un nivel de Laboratorio a un nivel Piloto. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
 73. Suárez-machín C, Garrido-carralero NA, Guevara-rodríguez CA. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar. 2016;50(1):20–8.
 74. Torres M. Valoración de la calidad microbiológica del producto en proceso en una planta productora de bebidas alcohólicas. Trab grado Present como requisito parcial para optar el título Microbiólogo Ind Pontif Univ Javeriana Bogotá Colomb. 2007;
 75. De Martin AM. Control del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* en la síntesis de glutatión. Editorial de la Universidad de Granada, editor. [Granada]: Universidad de Granada; 2005.
 76. Say R, Denizli A, Arica MY. Biosorption of cadmium (II), lead (II) and copper (II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Bioresour Technol. 2001;76(1):67–70.
 77. Rajput S, Thakur NK. Geological Controls for Gas Hydrates and Unconventionals. Elsevier; 2016.
 78. Talarposhti AM, Donnelly T, Anderson GK. COLOUR REMOVAL FROM A SIMULATED DYE WASTEWATER USING A TWO-PHASE ANAEROBIC PACKED BED REACTOR. 2001;35(2):425–32.
 79. Kumari K, Abraham TE. Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of

- fungi and yeast. *Bioresour Technol.* 2007;98(9):1704–10.
80. Volesky B, May-Phillips HA. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995;42(5):797–806.
 81. Aksu Z. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochem.* 2005;40(3–4):997–1026.
 82. Das N, Charumathi D. Remediation of synthetic dyes from wastewater using yeast- An overview. *Indian J Biotechnol.* 2012;11(4):369–80.
 83. Technical Data Sheet - Media Sabouraud Dextrose Broth (SDB) [Internet]. Available from: <http://himedialabs.com/TD/ME033.pdf>
 84. Microbiología Clínica. Escala de McFarland [Internet]. 21 de Febrero. 2018 [cited 2019 Aug 18]. Available from: <https://microbiologia671.wordpress.com/2018/02/21/practica-escala-de-mcfarland/>
 85. Parra E, Gordillo W, Pinzón WJ. Modelos de Crecimiento Poblacional: Enseñanza- Aprendizaje desde las Ecuaciones Recursivas. *Form Univ.* 2019;12(1):25–34.
 86. Aguilar CN, Sepúlveda-Torres L. Cinética microbiana de microorganismos biofertilizantes. In: Flores Gallegos A, Gonzáles V, Aguilar CN, Rodríguez Herrera R, editors. *Biofertilizantes microbianos*. Primera. Coahuila, México: Plaza y Valdés, SA de CV; 2014. p. 343–63.
 87. Dirección General de Salud Ambiental - Ministerio de Salud. Protocolo de Monitoreo de la Calidad Sanitaria de los Recursos Hídricos Superficiales. In 2017. p. 1–14.
 88. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 23rd Editi. Baird R, Eaton A, Rice E, editors. 2015. 5.21-5.22.
 89. Rocha Trejo JE. Producción de biocombustibles utilizando *Spirulina* sp como fuente

de carbono. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2011.

90. Narciandi RE, Torrens I, Santos A, Morales J, Herrera L. Producción de proquimosina bovina recombinante en *Saccharomyces cerevisiae* utilizando cultivo incrementado. *Biotechnol Apl.* 1991;8(3):319–25.
91. Abril N, Bárcena A, Fernández E, Galván A, Jorrín J, Peinado J, et al. Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Febrero.* 2008;17:2017.
92. Jaramillo Flórez MC, Jaramillo Ciro M, Quiroz Betancur M, Stefania MH. Potencial Biorremediación del Colorante Negro Azoico por Levadura Inmovilizada en Gelatina y Estudio Teórico de la Interacción Levadura- Colorante. *Ing USBMed.* 2018;9(1):30–8.
93. Francis A, J SK. Treatment of pre-treated textile wastewater using Moving-bed biofilm reactor. *Procedia Technol.* 2016;24:248–55.
94. Kishor R, Bharagava RN, Saxena G. Industrial wastewaters : The major sources of dyes contamination in environment , ecotoxicological effects and bioremediation approaches. In: Bharagava RN, editor. *Recent Advances in Environmental Management.* Boca Raton, FL, USA: Taylor & Francis Group; 2018.
95. Rosabal-Carbonell Y, Chang-Huerta L, Pérez-Aballe N, Morales-León J. Evaluación de la demanda química de oxígeno en aguas de la provincia de Granma , Cuba . *Rev Latinoam Recur Nat.* 2012;8(1):15–20.

ANEXOS

ANEXO N°1

- ❖ Evaluar la cinética de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* en un medio sintético con colorante.

Tabla 10. Absorbancias obtenidas por estándar de concentración celular de acuerdo a la escala de McFarland

Gráfico de calibración		
St	Concentración, cel/mL	Absorbancia
0	0	0
0.5	1.50E+08	0.103
1	3.00E+08	0.206
2	6.00E+08	0.407
3	9.00E+08	0.569
4	1.20E+09	0.774
5	1.50E+09	1.011
6	1.80E+09	1.125
7	2.10E+09	1.320
8	2.40E+09	1.472
9	2.70E+09	1.526
10	3.00E+09	1.702

Tabla 11. Ecuación de la recta obtenida a partir de la curva de calibración de la escala de Mc Farland

Longitud de onda, nm	625
Ecuación de la recta	$y = 6E-10x + 0.0244$
m	6.00E-10
b	0.0244

Tabla 12. Absorbancias y concentración celular obtenidas por cada muestra a los diferentes tiempos.

Muestras		
Tiempo, horas	Absorbancia	Concentración, cel/mL
0	0.137	1.88E+08
0.5	0.101	1.28E+08
1	0.127	1.71E+08
2	0.154	2.16E+08
3	0.246	3.69E+08
4	0.298	4.56E+08
5	0.315	4.84E+08
6	0.359	5.58E+08
10	0.576	9.19E+08
14	0.672	1.08E+09
18	0.801	1.29E+09
22	1.011	1.64E+09
26	1.145	1.87E+09
30	1.263	2.06E+09
34	1.297	2.12E+09
38	1.305	2.13E+09

❖ Evaluar la de remoción del colorante del efluente mediante *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla 13. Absorbancias obtenidas por concentración de colorante en mg/mL.

Gráfico de calibración		
St	Concentración, mg/mL	Absorbancia
0	0	0
1	20	0.511
2	40	1.014
3	60	1.516
4	80	2.024

Tabla 14. Longitud de onda y Ecuación de la recta utilizados para el gráfico de remoción del colorante por *Saccharomyces cerevisiae*

Longitud de onda, nm	597
Ecuación de la recta	$y = 0.0253x + 0.0024$
m	0.0253
b	0.0024

Tabla 15. Absorbancias y concentraciones en mg/mL obtenidas por muestra tomada a los diferentes tiempos

Muestras		
Tiempo, horas	Absorbancia	Concentración, mg/mL
0	1.213	47.85
0.5	1.171	46.19
1	1.198	47.26
2	1.167	46.03
3	1.146	45.20
4	1.137	44.85
5	1.101	43.42
6	1.022	40.30
10	0.925	36.47
14	0.781	30.77
18	0.673	26.51
22	0.561	22.08
26	0.439	17.26
30	0.382	15.00
34	0.308	12.08
38	0.279	10.93

❖ **Evaluar la eficiencia de la biodepuración del efluente mediante MBBR.**

Tabla 16. Concentración de DQO en mg/L de las muestras obtenidas a los diferentes tiempos en los tres sistemas MBBR (20 %, 40 %, 60 %)

	DQO, mg/L		
Tiempo, horas	20%	40%	60%
0	365	367	368
1	329	293	348
2	325	232	298
5	298	175	266
24	194	149	181
34	147	102	117
% disminución	59.7260274	72.2070845	68.2065217

Tabla 17. Concentración de colorante residual en mg/mL de las muestras obtenidas a los diferentes tiempos en los tres sistemas MBBR (20 %, 40 %, 60 %)

	Concentración de colorante, mg/mL		
Tiempo, horas	20%	40%	60%
0	52.356	51.209	52.672
1	51.605	50.814	52.474
2	51.526	49.984	52.316
5	51.447	49.668	51.723
24	51.249	48.324	50.458
34	50.775	40.814	49.589
% remoción	3.01977956	20.2994751	5.85321927

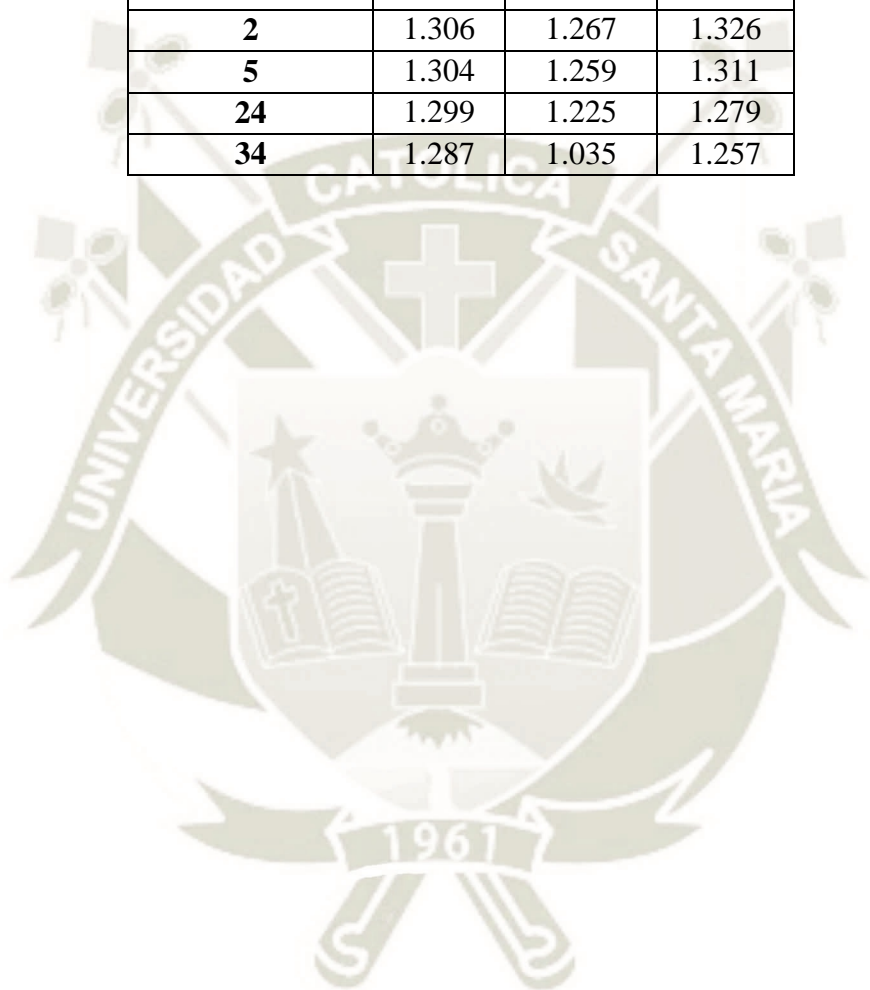
Tabla 18. Ecuación de la recta obtenida para el gráfico de remoción de colorante por

Saccharomyces cerevisiae

Ecuación de la recta	$y = 0.0253x + 0.0024$
m	0.0253
b	0.0024

Tabla 19. Absorbancias obtenidas en cada muestra tomada a los diferentes tiempos en cada sistema MBBR (20 %, 40 %, 60 %).

Tiempo, horas	Concentración de colorante, mg/mL		
	20%	40%	60%
0	1.327	1.298	1.335
1	1.308	1.288	1.330
2	1.306	1.267	1.326
5	1.304	1.259	1.311
24	1.299	1.225	1.279
34	1.287	1.035	1.257



ANEXO N°2

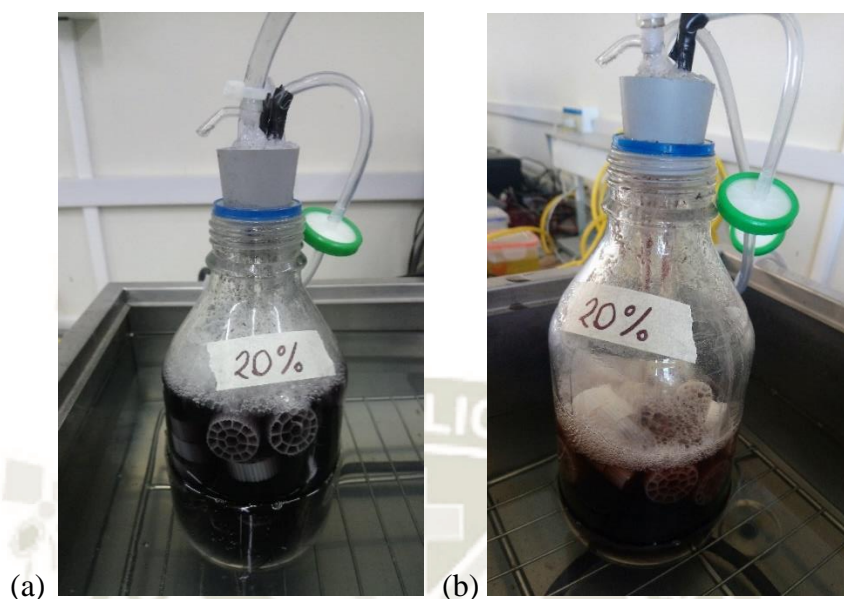


Figura 23. (a) Sistema MBBR al 20 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 0. (b) Sistema MBBR al 20 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 36

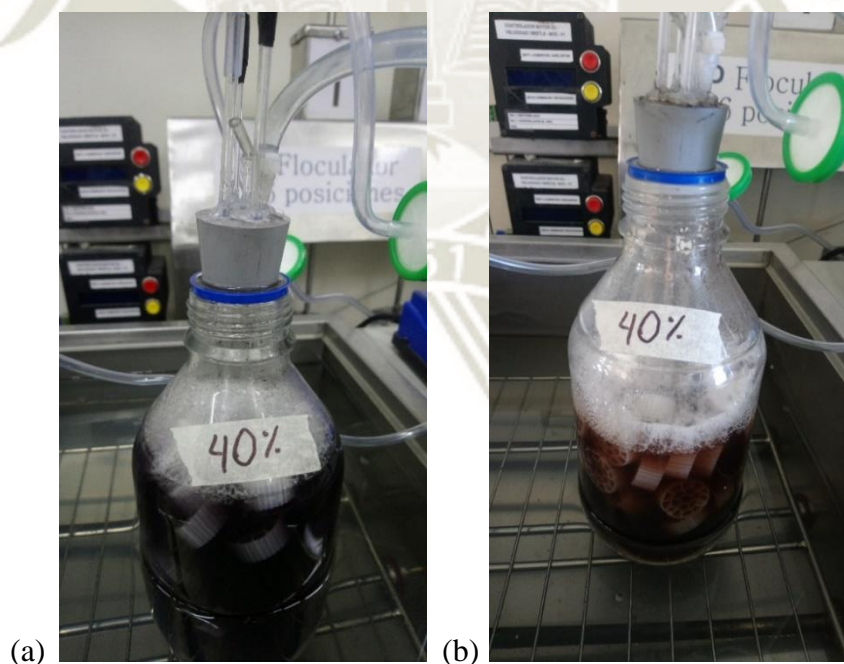


Figura 24. (a) Sistema MBBR al 40 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 0. (b) Sistema MBBR al 40 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 36

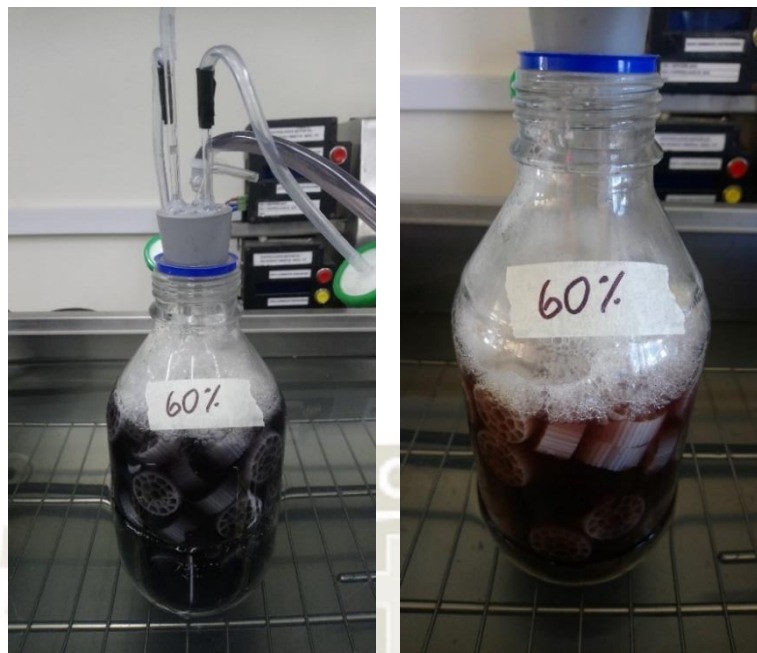


Figura 25. (a) Sistema MBBR al 60 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 0. (b) Sistema MBBR al 60 % de llenado de soportes con efluente textil a tiempo 36

ANEXO N°3

Tabla 20. Análisis de Varianza de un factor para la disminución de DQO en el efluente textil

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
20	6	1658	276.333333	7395.86667		
40	6	1318	219.666667	9614.26667		
60	6	1578	263	9504.8		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	10533.3333	2	5266.66667	0.59589062	0.563604869	3.68232034
Dentro de los grupos	132574.667	15	8838.31111	-	-	-
Total	143108	17	-	-	-	-

Tabla 21. Análisis de Varianza de un factor para la remoción de colorante en el efluente textil

RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
20%	6	308.956522	51.4927536	0.26709786		
40%	6	290.814229	48.4690382	15.0720472		
60%	6	309.233202	51.5388669	1.55332323		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	37.1376595	2	18.5688297	3.29771164	0.06500871	3.68232034
Dentro de los grupos	84.4623412	15	5.63082275	-	-	-
Total	121.600001	17	-	-	-	-